

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

**Interacción de linfocitos T CD4 con el segmento V3 de la glicoproteína 120
presente en el Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1**

Informe de Tesis

Presentado por

Juan Francisco Carrascoza Mayén

Para optar al título de

Químico

Guatemala, noviembre de 2008

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, <i>Ph.D.</i>	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto	Secretario
Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, M.A.	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	Vocal III
Br. Andrea Alejandra Alvarado Álvarez	Vocal IV
Br. Anibal Rodrigo Sevillanos Cambronero	Vocal V

Acto dedicado a mis padres:
Lourdes y Francisco

Agradecimientos

A mi Patria y la gloriosa Universidad de San Carlos por darme el futuro y formarme como persona, les debo todo.

A mis padres, por darme todo su apoyo y por todo lo que me han querido.

A Frank Carrascoza por su apoyo y consejo.

A quienes colaboraron conmigo sin ningún interés para que este trabajo fuera realidad: Licda. Margarita Paz, Dr. Cobar, Stephany Sánchez, Licda. Blanca Samayoa y Cesar Conde.

A Jacobo, Andrea, Chepe, Boris, Maries, Jose Juan, Rita, Fernando, Dulce, y las nutris, por hacerme pasar tantos buenos ratos, sobre todo cuando esos momentos eran difíciles.

A mis hermanos de Clüænded, porque con ellos formé la persona que soy.

A todos mis amigos y a los Químicos que me acompañaron en algún momento y que por algún motivo ya no están hoy conmigo.

Sigue caminado

Índice de contenido

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	3
3. Antecedentes.....	6
3.1 Historia de aparición del virus.....	6
3.1.1 Epidemiología.....	7
Tabla No. 1.....	8
3.1.2 Sintomatología.....	9
Tabla No. 2.....	10
Gráfica No.1.....	11
3.2 Conceptos Fundamentales de Inmunología.....	12
3.2.1 Quimiocinas	12
3.2.2 Función de las Quimiocinas.....	13
3.2.3 Características Estructurales.....	14
Gráfica No. 2.....	15
Gráfica No.3.....	15
3.2.4 Tipos:.....	17
3.2.4.1 Quimiocinas CC:.....	17
3.2.4.2 Quimiocinas CXC:.....	17
3.2.4.3 Quimiocinas C:.....	18
3.2.4.4 Quimiocinas CX3C:.....	18
3.2.5 Receptores y Antígenos.....	18
3.2.5.1 Antígenos.....	18
3.2.5.2 Receptores.....	20
3.3 Respuesta Inmune	24
Tabla No.3.....	25
Tabla No. 4.....	26
3.3.1 Células Dendríticas.....	27
3.3.2 Interacción CD y células B/T.....	27
3.3.3 Tejido Linfático como sitio de replicación viral.....	28
3.3.4 El sistema HLA y la respuesta inmune a VIH.....	29
3.3.5 La respuesta inmune celular VIH-específica.....	31
3.3.6 La respuesta inmune TH1/TH2.....	33
3.3.7 Respuesta inmune humoral específica a VIH-1.....	33
Tabla No.5.....	35
Gráfica No.4.....	35
3.3.8 Componentes Solubles Anti VIH de la Inmunidad Innata.....	36

3.4 Descripción del Virus.....	39
3.4.1 Estructura del Virión.....	39
3.4.2 Estructura Genómica.....	40
Gráfica No.5.....	40
Gráfica No. 6	44
3.5 Descripción del Ciclo de Replicación del Virus.....	45
Gráfica No. 7.....	49
3.6 Interacción Primaria del VIH con un linfocito CD4.....	50
3.6.1 Reacción de los correceptores.....	52
3.6.2 Arreglos del dominio interno:.....	53
3.6.3 Fusión de la membrana	54
Gráfica No.8.....	58
Gráfica No.9.....	59
3.7 Estudios Previos Sobre la Estructura de CD4.....	61
3.7.1 Estructura General:.....	61
Gráfica No.10.....	62
3.7.2 Secciones Estructurales de CD4 que interactúan con gp120.....	63
3.8 Estudios Previos Sobre la Estructura de gp120.....	64
3.8.1 Secciones Estructurales de gp120.....	64
Gráfica No.11.....	64
Gráfica No.12.....	65
3.8.2 Estructura de gp120.....	66
3.9 Estructura del Correceptor CXCR4.....	67
3.10 Estructura del Correceptor CCR5.....	69
4. Justificación.....	70
5. Objetivos.....	71
5.1 Objetivo General:.....	71
5.2 Objetivos Específicos:.....	71
6. Hipótesis.....	72
7. Materiales y Métodos.....	73
7.1 Universo de trabajo:.....	73
7.2 Materiales:.....	73
7.2.1 Investigaciones previas.....	73
7.2.2 Hardware:.....	73
7.2.3 Software:.....	74
7.3 Métodos.....	74

7.3.1 Criterios de inclusión y exclusión de artículos revisados.....	74
7.3.2 Método de Análisis Estructural Químico.....	75
7.3.3 Procedimiento.....	76
Tabla No. 6: Comparación entre las Cepas JRFL y HXBC2 en su región V3.....	79
8. Resultados.....	84
8.1 Resultados de Cada Corrida.....	84
Gráfica No.13.....	85
Tabla No.7: Comparación entre rangos de la Corrida 1.....	90
Gráfica No. 14.....	91
Tabla No.8: Comparación entre rangos de la Corrida 2.....	97
Gráfica No.15.....	98
Tabla No.9: Comparación entre rangos de la Corrida 3.....	101
Gráfica No.16.....	103
Tabla No.10: Comparación entre otros parámetros de cada Rango en la Corrida 4.....	110
Gráfica No.17.....	111
Tabla No.11: Comparación entre rangos de la Corrida 5.....	114
Gráfica No.18.....	115
Tabla No.12: Comparación entre rangos de la Corrida 6.....	122
Gráfica No.19.....	123
Tabla No.13: Comparación entre rangos de la Corrida 7.....	127
Gráfica No.20.....	129
Tabla No.14: detalles de la Corrida 8, Rango 1/100.....	133
Gráfica No.21:.....	134
9.Discusión.....	135
9.1 Esquema Estructural Desarrollado del complejo CD4-gp120.....	136
Gráfica No.22:.....	137
9.2 Determinación del Área de Interacción de gp120 con el Correceptor CCR5 de los Linfocitos Th CD4+.....	138
Tabla No. 15: Comparación entre las Corridas 1 y 2.....	139
Tabla No.16: Datos adicionales de las Corridas 1 y 2.....	140
Gráfica No.23: Interacción en la Corrida 3, Rango 1.....	144
Tabla No.17: Comparación entre las Corridas 3, 4 y 5.....	145
Tabla No.18: Comparación entre las Corridas 6 y 7.....	150
Tabla No.19: Comparación entre las corridas relacionadas con la interacción entre ECL2 de CCR5 y V3 de gp120.....	154
Gráfica No.24: Análisis de las interacciones moleculares en C6R13, C6R14 y C8R1.....	157
9.3 Mecanismos de interacción y de reacción del segmento variable V3 de gp120 con el correceptor CCR5.....	162
9.3.1 Mecanismos de Reacción.....	163

9.3.1.1 Análisis de C4R4.....	163
9.3.1.2 Análisis de C6R14.....	166
9.3.1.3 Análisis de C8R1.....	168
10. Conclusiones.....	171
11. Recomendaciones.....	173
12. Referencias.....	175
10. Anexos.....	205

1. Resumen

La entrada del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) a un linfocito T_h se inicia por la interacción del trímero viral gp160, el cual contiene en su extremo la glicoproteína gp120. Ésta interactúa directamente con el receptor CD4 del linfocito y posteriormente el complejo CD4-gp120 reacciona con el correceptor CCR5 presente en los linfocitos T_h CD4+.

Esta investigación propone una explicación a la conducta de la glicoproteína gp120, para ello se han utilizado programas computacionales de enlace proteína-ligando con el fin de obtener detalles de las reacciones bioquímicas existentes entre los epítomos de gp120 en VIH con el correceptor CCR5, particularmente se describen las reacciones entre el tercer segmento variable (V3) de gp120 y el segundo segmento extracelular (ECL2) del correceptor CCR5. También se ha tomado particular atención en las interacciones que se dan con el segmento N-terminal del correceptor CCR5 y gp120 de VIH-1 con el fin de explicar la orientación entre CCR5 y gp120 que forman el complejo CCR5-gp120. Además se ha diseñado un modelo molecular computacional que explica y es coherente con los resultados obtenidos entre esta investigación y las investigaciones previas.

Los resultados encontrados muestran que existen regiones específicas en el segmento V3 de gp120 que interactúan con el segundo segmento extracelular en CCR5, y ha sido posible proponer un mecanismo de reacción que explica la relación entre ambas proteínas que comienzan con la interacción del segmento N-

terminal en CCR5 con el sistema V1/V2 en gp120 de VIH-1, sigue el proceso de enlace con la interacción de la ARG440 que ubica y se enlaza a CCR5 y finalmente ocurre el enlace entre el segundo segmento extracelular en CCR5 de los linfocitos T_h CD4+ y el segmento variable 3 de VIH-1.

Esta propuesta es coherente con lo que ocurre en las cepas X5, X5/R4 y R4 de VIH que seleccionan entre diferentes correceptores (CXCR4 y CCR5 respectivamente) y sugiere que existen aminoácidos en V3 de gp120 cuya función es la orientación específica a un enlace estable por todas las regiones de reacción entre gp120 de VIH-1 y el correceptor CCR5.

2. Introducción

Para poder encontrar la cura de una enfermedad, es necesario conocer su naturaleza. Respecto a las investigaciones realizadas sobre el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), que genera el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), las cuales son muy abundantes, no existen aun más que soluciones paliativas y propuestas de vacunas que apenas empiezan a ser desarrolladas y probadas.

En Guatemala, en este momento, hay muy pocas entidades que llevan estudios sobre la expansión y el tipo de evolución que ha sufrido la enfermedad.

El presente trabajo absorbe la literatura de vanguardia y los trabajos más sobresalientes hasta la fecha, con el fin de generar conclusiones a nivel biomolecular con el fin de explicar el mecanismo de reacción inicial de la infección del linfocito T_h CD4+. Se presenta una revisión bibliográfica de publicaciones seleccionadas y se analizan desde el punto de vista químico para ampliar detalles y obtener nuevas conclusiones sobre la naturaleza de las reacciones bioquímicas que se llevan a cabo en este proceso.

Uno de los aspectos más importantes es la determinación de los mecanismos biomoleculares y las reacciones químicas que utiliza el virus en el contacto inicial

de las proteínas de su cubierta de membrana con la membrana de la célula hospedera, lo que es clave para que la cápside viral pueda penetrar en la célula.

Se observará con particular atención las estructuras químicas responsables de la relación primaria existente en la sección V3 de la glicoproteína viral gp120. La sección V3 se encuentra en la membrana de envoltura externa, responsable de la reacción química inicial del VIH tipo 1 y es activada contra el correceptor del linfocito T CD4+ en el hospedero. Es éste el paso que también da fundamento a la comprensión del tropismo del virus hacia las células que reconoce como hospederas, dado que el tropismo de VIH está directamente relacionado a los correceptores presentes en sus células blanco. Este hecho puede sugerir eventualmente el desarrollo de inhibidores de la unión linfocito CD4 - VIH, siendo una potencial alternativa de tratamiento médico que ya se ha comenzado a estudiar.

Por lo tanto el objetivo esencial de este trabajo es explicar ese mecanismo de reacción, a fin de encontrar una justificación lógica en los eventos que suceden en el hospedero durante el inicio del proceso de infección por VIH.

El ambiente de este trabajo se sitúa en el campo de la química orgánica para explicar los mecanismos de reacción que siguen los grupos funcionales de los aminoácidos que inician el mecanismo de infección por VIH en la célula defensora linfocito T CD4+. Para esto, es necesario explicar ampliamente con una base inmunológica, la bioquímica de estos procesos.

Las referencias bibliográficas usadas en este trabajo han sido seleccionadas con base en el criterio meta analítico como método de orden científico, puesto que esos estudios son la base de datos utilizada. El presente trabajo es una investigación bibliográfica comparativa con el fin de interpretar los mecanismos de reacción más probables y representativos.

3. Antecedentes

3.1 Historia de aparición del virus

El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), reconocido por causar el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), es un retrovirus aislado por primera vez por el grupo francés de Barre-Sinoussi en 1983 y confirmado el mismo año por Cherman *et al.* y posteriormente por Broder y Gallo en 1984 (1-3).

Aunque se tiene idea de su forma transmisible entre seres humanos a partir de los finales de los setenta, presente en las poblaciones de Sudáfrica, fueron reportados los primeros casos en homosexuales de Inglaterra en 1981 y en Estados Unidos en la misma fecha, en lo que parecía ser un extraño reporte de *neumonía por Pneumocystis* presente en cinco homosexuales (MMWR *Morb Mortal Wkly.* 1981) (4), El Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos (CDC por sus siglas en inglés) fue el primero que reportó una historia clínica completa de los primeros pacientes con SIDA (5-12).

Pronto se identificó que la enfermedad no era exclusiva en homosexuales, cuando comenzó en grupos heterosexuales de Haití, de México (13), en usuarios de drogas por inyección intravenosa (14) y en niños cuyas madres mostraban SIDA (15). Para finales de 1982 ya se conocía un aproximado de 87 casos reportados y 12 de los cuales eran en menores de edad, y de estos 4 oscilaban entre los 6-17 meses de edad (16, 17).

Actualmente son reconocidos dos tipos de virus genéticamente relacionados que causan inmunodeficiencia humana, el VIH tipo 1 y el VIH tipo 2 (VIH-1 Y VIH-2

respectivamente), de los cuales VIH-1 es más mortífero y su prevalencia domina los continentes europeo, África del norte, éste, Asia y América; por su lado VIH-2 se encuentra diseminado en África del oeste y es menos patógeno (18).

Se conoce también que el VIH-1 tiene su reservorio en el Virus de Inmunodeficiencia Simia (VIS) del chimpancé (*Pan troglodytes*) mientras que VIH-2 tiene su reservorio en el VIS del mono gris africano sooty mangabeys (*Cercocebus atys*) (19-27). Actualmente se han identificado una serie de subfamilias de VIH-1 filología basada en la variabilidad de sus proteínas de cubierta de VIH-1, observando tres grandes grupos M, N y O. El grupo M y todos sus subtipos que son A, B, C, D, F, G, H, J, K, son los más difundido a nivel mundial, y cada sub tipo puede presentar sub sub-tipos, por ejemplo A1 y A2. En el caso de VIH-2 hay subtipos de A-H y el más difundido es el B (28).

3.1.1 Epidemiología

Según el programa conjunto de Naciones Unidas para el VIH/SIDA y la Organización Mundial de la Salud, hasta diciembre de 2007 cada día 6,800 personas se infectan con el virus y 5,700 fallecen por causa del síndrome (29,30).

La prevalencia mundial de la infección se mantiene en el mismo nivel, con una tasa de supervivencia mayor, y por lo que este grupo (infectado) se acumula, debido a la aplicación de los nuevos tratamientos que retardan el deceso por SIDA.

Aunque aun existe prioridad en el mundo sobre la erradicación de VIH, los resultados parecen ser alentadores al mostrar en varios países una disminución del número de casos nuevos infectados por año. Hasta 2007 existían 32.2 millones

de personas reportadas que viven con VIH con un total de 2.5 millones de nuevas infecciones.

Respecto a Guatemala, los datos provistos por el Ministerio de Salud Pública en 2007 (31, 32) desde enero de 1984 hasta octubre de 2007 hay un total de 10,667 casos reportados, de los cuales 519 casos son transmisiones de madre a hijo. Este informe no reporta por falta de información, el porcentaje de personas que están vivas con VIH y por tanto tampoco reporta el número de defunciones a causa de SIDA en ninguna fecha. Lo que se tiene son estimaciones generadas por el programa de ordenador Spectrum 2.39, el cual brinda datos en base a la estimación realizada en 2004, que se ilustra en la siguiente tabla:

Tabla No. 1

Proyecciones de casos VIH y SIDA Guatemala 2005			
Categorías	2005	2010	2015
Adultos >15 años viviendo con VIH (en miles)	54.87	81.56	123.5
Adultos >15 años con nuevas infecciones (en miles)	7.35	9.74	12.88
Adultos >15 años con muerte a causa de SIDA (en miles)	3.46	1.55	3.65
Niños (0-14 años) viviendo con VIH/SIDA (en miles)	2.7	3.83	4.3
Niños (0-14 años) con nuevas infecciones VIH	550	435	380
Niños (0-14 años) con muertes por causa del SIDA	109	103	138
Adultos con prevalencia (15 - 49 años) %	0.9	1.16	1.55
Fuente: proyecciones de VIH y SIDA, según Spectrum 2.39, según intervención 2005 (Ref. 31)			

Los datos demuestran que la epidemia aún no se ha estabilizado en Guatemala. Solamente se sabe que entre 2003 y 2007 se ha reportado el 63% (3,658) de los casos entre personas que van de los 20 a los 39 años, a causa de la falta de un programa de vigilancia antes de esa fecha (32).

3.1.2 Sintomatología

El esquema sintomático que produce VIH es el siguiente (24, 27):

1. Una infección primaria o aguda o primoinfección,
2. Un período asintomático
3. Progresión a SIDA
4. SIDA
5. Muerte.

La infección primaria se ve caracterizada por un incremento muy veloz de carga viral en la sangre a partir del sitio de inoculación en la persona. En este momento, por cada célula T CD4 infectada se producen otras 20 nuevas células infectadas llegando a alcanzar rápidamente niveles de hasta 10^6 /ml e incluso 10^8 /ml. Esta viremia alcanza los órganos linfoides.

La consecuencia directa es un descenso brusco en la relación de linfocitos CD4/CD8 lo que produce una virtual inmunodeficiencia que se observa en el paciente mediante fiebres altas, sudoraciones nocturnas, diarreas crónicas inexplicables (para mayor detalle observar el cuadro clínico de una infección primaria). La duración de este periodo depende de la capacidad de reacción inmune de cada paciente.

Tabla No. 2

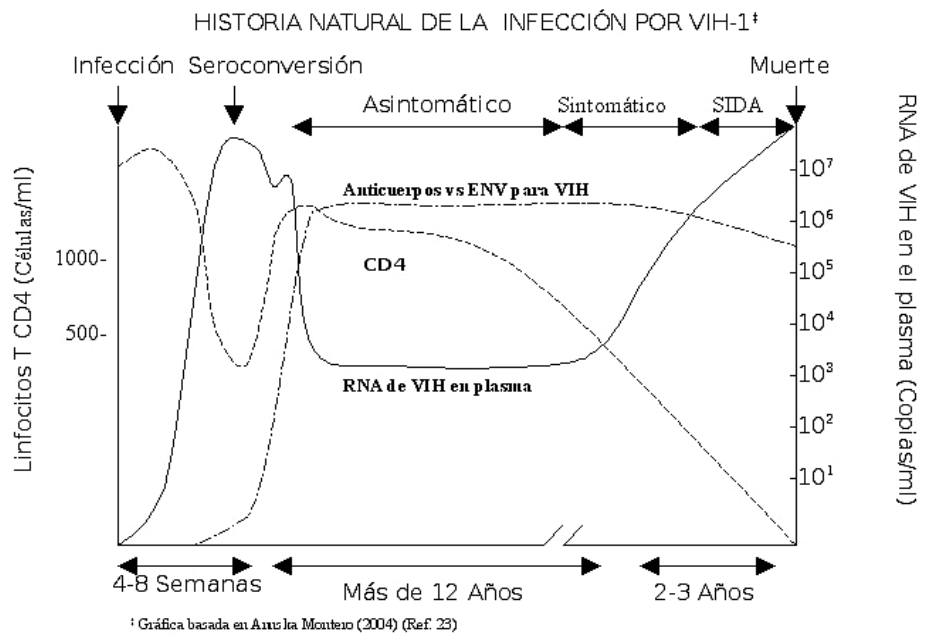
Características clínicas de infección aguda por VIH
Fiebre y diaforesis
Mialgias y artralgias (dolor muscular y huesos)
Malestar y letargo
Linfadenopatía e hipertrofia del bazo
Faringitis
Anorexia, náusea y vómito
Cefalea y fotofobia
Exantema macular (degeneración de la parte posterior del ojo)

Tabla basada en Stites (2002) (27)

En las semanas posteriores se obtiene la primera respuesta inmune del cuerpo a cargo de los linfocitos T citotóxicos CTL CD8+, lo cual causa un decremento severo de la carga viral en las proximidades de la sexta semana pasada la primoinfección, de hecho alcanza un punto de estabilidad y el virus parece guardar una latencia clínica, aunque realmente lo que sucede es un equilibrio entre la producción y destrucción del virus, por lo cual el paciente se vuelve asintomático durante varios años (25,26).

La progresión a SIDA se empieza a ver marcada por la ruptura paulatina del equilibrio mantenido entre producción-destrucción del virus (24).

Gráfica No.1



3.2 Conceptos Fundamentales de Inmunología

Anticuerpos o Inmunoglobulinas: son proteínas altamente específicas que son producidas en respuesta a antígenos específicos. Los anticuerpos o inmunoglobulinas son producidos por los linfocitos B (33).

Patógeno: es toda aquella entidad biológica capaz de producir enfermedad o daño en la biología de un hospedero.

Citocinas: es un grupo diverso de péptidos y glucoproteínas de señalización intracelular, cuyos pesos moleculares oscilan entre los 6,000 y 60,000 UMAS. Las citocinas son parte de las secreciones normales de la célula con el fin de provocar una infinidad de estímulos. De tal cuenta, cada citocina produce un efecto en particular sobre su célula blanco mediante un receptor específico ubicado en dicha célula. Actúan a concentraciones muy bajas (10^{-9} - 10^{-15} M). Entre sus funciones no solamente se encuentra la respuesta inmune, sino también inflamatoria, el crecimiento, la movilidad, la diferenciación celular (27, 37).

3.2.1 Quimiocinas

Sustancias liberadas por las células, son de la familia de las citocinas, generalmente no superan los 8-10 kilodaltons por lo cual se dice que son proteínas muy pequeñas que cumplen varias funciones. Las quimiocinas sirven como comunicación de una célula a otra mediante proteínas G en receptores extramembrana o transmembrana celular. Cada quimiocina tiene un receptor específico, pero cada receptor puede ejercer para más de una quimiocina, y la célula que expresa dicho receptor se conoce como célula objetivo. Otra

característica es que poseen 4 grupos cisteína, y son definidas de acuerdo a la posición de dichas cisteínas. Son estos mismos grupos los que les confieren su conformación tridimensional característica y necesaria para ser aceptada por los receptores en una relación exacta llave-cerradura.

Existen dos categorías esenciales de quimiocinas:

- pro-inflamatorias
- homeostáticas

Las citocinas pro-inflamatorias se ven involucradas en una función quimiotáctica durante una respuesta inmune en una infección.

Las citocinas homeostáticas son responsables de la quimiotaxis que desarrolla el tejido, lo mantiene o lo hace cambiar.

Las quimiocinas se encuentran esencialmente en vertebrados, algunos virus y algunas bacterias pero no en invertebrados (38).

3.2.2 Función de las Quimiocinas

El principal rol que juegan las quimiocinas es atraer células mediante gradientes de concentración, por lo que se puede decir que las células objetivo serán quimiotrópicas.

Algunas quimiocinas controlan el sistema inmune atrayendo linfocitos y activando ganglios y nódulos linfáticos. Por tanto éstas son las responsables de desplegar anticuerpos e interactuar contra agentes patógenos (39, 40).

Las quimiocinas homeostáticas por su parte, son secretadas sin necesidad de un estímulo en su célula fuente. Éstas pueden promover la angiogénesis (creación de nuevos vasos sanguíneos), o bien guiar a otras células que son críticas para ejercer señales de maduración celular en tejidos.

Otras quimiocinas son responsables de la acción inflamatoria que se ejerce en contra de bacterias, virus o bien agentes que causan daño en el tejido, como sílica o cristales de urato como ocurre en la gota (artritis metabólica generada por la acumulación del ácido úrico).

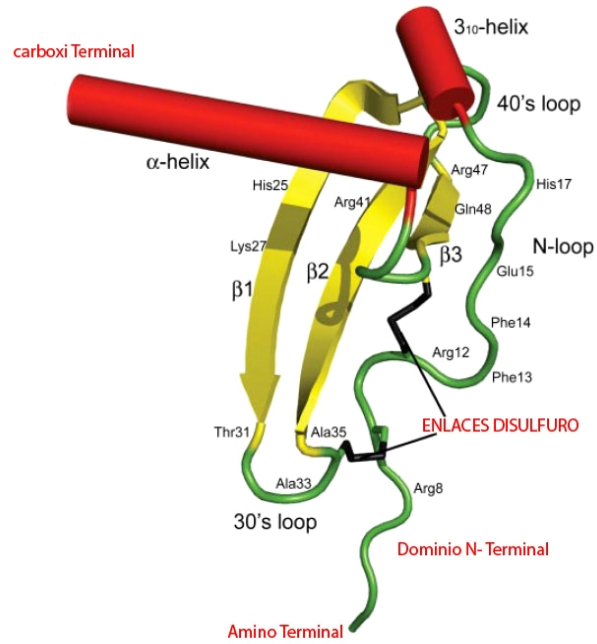
Las quimiocinas inflamatorias son responsables de generar respuestas inmunes que atraen neutrófilos, leucocitos, monocitos. En sí, estas quimiocinas regulan tanto el sistema inmune innato como el sistema inmune adaptado (41).

3.2.3 Características Estructurales

Todas las quimiocinas tienen una forma típica de llave griega, adquirida gracias a sus puentes disulfuro proveniente de los residuos cisteína que las caracteriza.

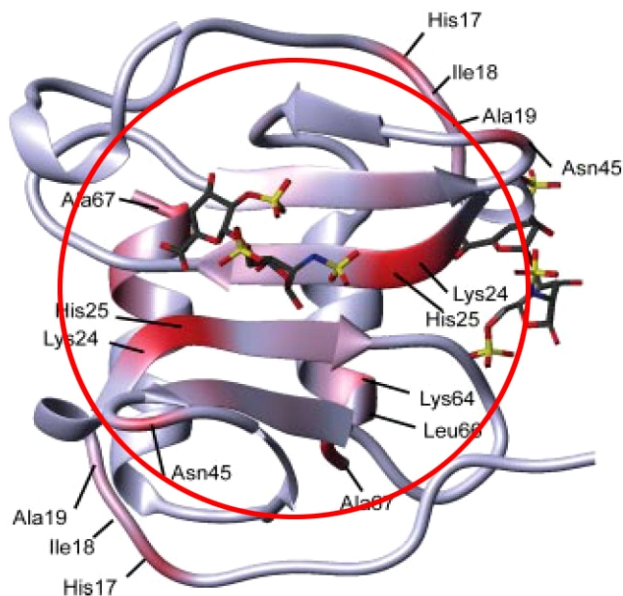
Gráfica No. 2

Estructura de la quimiocina CXCL12: En la gráfica se observan los puentes disulfuro señalados, la posición de éstos es característico de las quimiocinas CXC



Gráfica No.3

Estructura de la quimiocina CXCL12: Se observa encerrada en un círculo la típica forma de llave griega que caracteriza a las quimiocinas. Gráficas obtenidas de James *et al.* (2007) (185).



La “llave griega” en bioquímica se refiere a un tipo de estructura súper-secundaria (42).

Más que esto, su estructura característica se debe a que todas las quimiocinas hasta ahora reportadas comparten entre 50 y 60 % de similitud en su secuencia aminoácida y genética.

En sí, están conformadas como pro-proteínas que comienzan con 20 aminoácidos enlazados a la porción activa de la molécula. Los primeros dos grupos cisteína están presentes cerca de uno de los extremos N terminales, la tercera cisteína se encuentra en el centro y la cuarta generalmente está muy cercana al extremo C Terminal de la proteína.

El segmento en asa que se encuentra cercano al inicio generalmente se conforma por 10 aminoácidos y se conoce como segmento N. Seguido de éste se encuentran los segmentos Hélice 3_{10} , cadena β y hélice α C - Terminal. Estas hélices y cadenas están conectadas por segmentos llamados 30s 40s y 50s, la tercera y cuarta cisteína están localizadas entre los segmentos 30s y 50s.

3.2.4 Tipos:

Los miembros de las quimiocinas están clasificados en cuatro grupos de acuerdo a la posición de los primeros dos residuos de cisteína:

- CC
- C
- CXC

- CX₃C

3.2.4.1 Quimiocinas CC:

También conocidas como β -quimiocinas tienen dos cisteínas adyacentes a su grupo N- amino Terminal. Aquí se encuentran las principales familias de quimiocinas atrayentes de monocitos, células NK, células dendríticas y macrófagos. Estas quimiocinas también pueden atraer eosinófilos que expresan CCR3. CCL5 (también llamado SDF-1 o RANTES) atrae células como células T, eosinófilos y basófilos que expresan el receptor CCR5 (43, 44).

3.2.4.2 Quimiocinas CXC:

Las dos cisteínas N-terminales de las quimiocinas CXC (o α -quimiocinas) están separadas por un aminoácido, representado en su nombre por una "X". Existen 17 diferentes quimiocinas CXC descritas en mamíferos, que son subdivididas en dos categorías, éstas con una secuencia de aminoácidos específica (o motif) de Ácido Glutámico - Leucina - Arginina (o ELR por sus abreviaturas) inmediatamente antes de la primera cisteína del motif CXC (ELR-positivas), y las que no tienen un motif ELR (ELR -negativas). Estas quimiocinas inducen neutrófilos, y linfocitos CXC receptores (45).

3.2.4.3 Quimiocinas C:

Conocidas como γ -quimiocinas, diferentes a las otras, pues sólo tienen dos cisteínas: una cisteína N-terminal y una cisteína al final. En este subgrupo hay dos quimiocinas: Linfotactina- α y linfotactina- β . Son atractores de células T precursoras en el timo.

3.2.4.4 Quimiocinas CX₃C:

Este grupo de quimiocinas posee tres aminoácidos entre sus dos cisteínas (δ -quimiocinas). La única reportada es la fractalquina (CX₃CL1). Sirve como quimioatrayente y como adhesivo molecular (46).

3.2.5 Receptores y Antígenos

3.2.5.1 Antígenos

Aquellas sustancias que son capaces de reaccionar con un receptor específico que se encuentran en las células blancas sanguíneas, los hay antígenos propios y extraños. Generan anticuerpos. El antígeno no puede estimular por si solo una respuesta inmune (Está diseñado para producir una respuesta directa dentro del sistema inmune). Todos los inmunógenos son antígenos, pero no todos los antígenos son inmunógenos (34-36).

Inmunógenos son aquellas moléculas que son capaces de producir una respuesta inmune. Se enlazan a receptores específicos y proveen las señales necesarias para provocar una respuesta inmune.

Un mismo antígeno puede tener más de un determinante antigénico (epítipo en un anticuerpo), y cada uno de estos determinantes comprende diferentes aminoácidos (4-6 regularmente) o azúcares, la respuesta inmune resultante puede comprender anticuerpos que reconozcan solo unos de ellos.

Un mismo antígeno al ser introducido en dos diferentes personas puede activar diferentes epítomos, lo que sugiere que el rango de epítomos reconocidos está bajo control genético.

Los antígenos leucocitarios humanos HLA^β son las moléculas que identifican a un individuo y son producto del grupo de genes del complejo mayor de histocompatibilidad MHC^{*}. Estos pueden ser de 3 categorías: Clase I, Clase II y Clase III.

Clase I: lo presentan todas las células nucleadas y plaquetas.

Clase II: reservado para Macrófagos, linfocitos B y células dendríticas.

Clase III: presente en enzimas, elementos de control en procesos antigénicos y en el grupo de proteínas del sistema de complemento.

El nivel de HLA que se expresa en una superficie celular está regulado por citocinas y otros antígenos (27, 52, 53).

El sitio del Antígeno que se enlaza a su receptor, se conoce como epítomo y se llama también Determinante Antigénico.

^βHLA Por sus siglas en ingles Human Leucocitary Antigen.

^{*}MHC Por sus siglas en ingles Major Hitocomptabilty Complex.

3.2.5.2 Receptores

Los receptores son proteínas que se encuentran en la membrana o el citoplasma. Su función es generar cambios fisiológicos a través de su activación. Estos receptores poseen ligandos que son los que reaccionan (interactúan) con otras sustancias, como las quimiocinas (47, 48).

Sin embargo, organismos patógenos pueden utilizar los receptores como medio de entrada al citoplasma celular, se pueden citar algunos ejemplos como *Plasmodium vivax* que utiliza el antígeno DARC (un receptor de eritrocitos), *Streptococcus pneumoniae* utiliza el receptor PARF, y VIH utiliza los receptores de quimiocina CCR5 y CXCR4.

Los receptores de quimiocina pertenecen a la superfamilia de receptores de 7 dominios de transmembrana, que representan un grupo de receptores unidos a proteínas G (49, 50). Estos receptores se utilizan para ubicar a las células bajo un tejido particular (51).

Según su posición pueden clasificarse en:

- Transmembrana
- Periféricos
- Metabotrópicos
- Acoplados a proteínas G.

Según su función se clasifican en:

- Receptores Fc

- Receptor de antígenos de células B.
- Receptores de células T.
- Receptores de células NK.

Receptores antigénicos de células B:

Estos se enlazan vía inmunoglobulina de membrana, son inmunoglobulinas que se diferencian de las inmunoglobulinas secretadas en que poseen una región intercitoplásmica y también una región citoplásmica en la región Fc (carboxi) Terminal de la región de la cadena pesada. Cuando el antígeno se enlaza a la inmunoglobulina de membrana la célula comienza una transducción de señal.

Las células B tienen en su membrana celular también inmunoglobulinas que pueden secretar, y de hecho hacer específicas, lo que da origen a la superfamilia de inmunoglobulinas que son en su región citoplásmica y extracelular idénticas a las Ig de membrana, diferenciándose en su corta cola citoplásmica que se conoce como ITAMs^{fi} que permiten la activación de la señal característica.

Receptores Fc:

Los receptores Fc son los que reaccionan con las inmunoglobulinas en su región Fc. Y pueden ser clasificados según la región Fc que enlazan:

FcεR (receptor IgE),

FcαR (receptor IgA),

FcγR (receptor IgG), etc.

De los cuales FcγR existen tres grupos: FcγRI, FcγRII, FcγRIII que tienen diferente afinidad por IgG y otros complejos inmunes (27, 52).

^{fi}ITAMs del inglés Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs

Inmunoglobulinas:

Son los anticuerpos secretados o presentes en las membranas de las células blancas, se ubican en los líquidos corporales o el plasma, juegan un rol primordial en la respuesta inmune, se enlazan a antígenos específicos. Están estructurados por una cadena liviana y una pesada.

Hay 5 clases de inmunoglobulinas, según el tipo de cadena pesada: IgG, IgA, IgM, IgE e IgD.

IgG: producida durante la respuesta inmune secundaria, es la única inmunoglobulina con actividad antitóxica, muchas células (monocitos/macrófagos, células B, células NK y algunas células T) expresan éstas moléculas en su superficie las cuales enlazan IgG a través de su región Fc, éstos receptores son los conocidos como Receptores Fc, que en los macrófagos permiten hacerlos específicos a la fagocitosis de determinados antígenos.

IgM: es el principal anticuerpo producido durante la respuesta inmune primaria, presente en la sangre y en las paredes de células B principalmente.

IgA: es el anticuerpo principal específico, secretado a la membrana mucosa donde se encuentra como dímero.

IgD: indica la maduración y diferenciación de una célula clase B, está enlazado a la respuesta humoral, interfiere con la replicación viral, mantiene las células B de memoria y está relacionado con TNF, IL-1B y IL-1.

IgE: presentes en los mastocitos que se desgranulan al activarse ésta, teniendo como consecuencia la liberación de histamina durante reacciones alérgicas, también están presentes en infecciones por helmintos, por lo que se sabe que actúan sobre basófilos.

Receptor de células T

Se enlaza particularmente a anticuerpos específicos. Posee 2 dominios extracelulares, uno constante y uno variable con secciones de unión (J) intermedias, cola citoplasmática corta y una región transmembrana.

Sus regiones variables de cadenas alfa y beta juntas forman el sitio de enlace antigénico del receptor. Se sugiere que tiene forma de hoja beta plegada como en las regiones variables de moléculas MHC. En el dominio variable, las 3 regiones hipervariables están envueltas en el enlace antigénico.

Receptor de células NK:

Las células NK matan células tumorales y células infectadas por virus, trabajan por medio del reconocimiento de antígenos específicos: Las células asesinas de receptor inmunoglobulina KIR[Ⓐ] (Ig transmembrana), y las transcriptoras de inmunoglobulina ILT[§], estas parecen identificarse con el péptido presente en las moléculas MHC clase I de la célula objetivo.

[Ⓐ]KIR abreviatura del inglés The killer cell iglike receptor.

[§]ILT abreviatura del inglés Ilike transcripts.

3.3 Respuesta Inmune

Existe una clasificación importante para comprender la reacción inmunológica del cuerpo ante la invasión por VIH. El Sistema Inmune Innato que como lo indica su nombre viene como producto de la herencia de código genético propio de cada individuo, y el Sistema Inmune Adquirido que se basa en un sistema avanzado de inmunidad específica que se obtiene producto del reconocimiento estructural de los antígenos que estimulan respuestas específicas.

La inmunidad innata en contraste tiene una alta velocidad de respuesta inmune, carece de memoria y se basa en un sistema de reconocimiento general.

El vínculo entre sistema inmune innato y adquirido son las células dendríticas, macrófagos y células T que son quienes dirigen una respuesta inmune determinada.

Tabla No.3

A continuación se presenta una tabla esquemática que ubica los diferentes tipos de células que componen el sistema inmunitario humano.

Sistema Inmune Innato	Sistema Inmune Adquirido
Células dendríticas Macrófagos Neutrófilos Células Natural Killer Células Dendríticas Plasmocitoides (PDC's) Células CD 8 No tóxicas Células B-1 Factores Solubles Citocinas Quimiocinas Defensinas Complemento Proteínas Unidas a Lectina (Colectinas) Fiebre (fase aguda)	Células Dendríticas Macrófagos Linfocitos B Linfocitos CD4+ Linfocitos CD8+ (citotóxicas) Factores Solubles Citocinas (IL-12).

Tabla extraída de Levy J.A. (2003) (54).

Durante la respuesta inmune provocada por VIH, cada uno de los elementos que componen el sistema inmune juega un papel:

Tabla No. 4

Factores del Paciente Asociados a Resistencia y-o Progresión de la Infección por VIH (27)	
Inmunidad Celular	Efectos sobre la transmisión y progresión de la enfermedad
Células T citotóxicas	Eliminan viriones y células infectadas, papel prominente en el control de la viremia, retraso en la progresión de la enfermedad y quizás, prevención de la enfermedad.
Factores Solubles derivados de células T CD8+	MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, SDF-1, IL-16, inhiben la replicación de VIH de una manera no citotóxica.
Respuestas T- <i>helper</i>	La preservación de ésta respuesta podría ser vital para la preservación de la respuesta CTL.
Inmunidad Humoral	Prevención y control de progresión de la enfermedad
Factores Locales:	-Podrían elevar la regulación de replicación de VIH.
- ETS y citocinas	
- CTL y anticuerpos	- Prevención de transmisión y Prevención de enfermedad.
- Células dendríticas	Facilitan la infección de células T por captura y transporte de VIH a Nódulos Linfáticos y células T activadas.
Receptores de Quimiocinas	
Delección de CCR5- Δ 32	Homocigosis asociada con susceptibilidad disminuida de la Infección por cepas R5. Heterocigosis asociada con progresión de la enfermedad retardada.
Mutación CCR2-V641	Heterocigosis asociada con progresión de la enfermedad retardada.
Polimorfismo del promotor CCR5	Homocigosis del polimorfismo 59029-G se asocia con una progresión más lenta y la homocigosis 59356-T a transmisión perinatal aumentada.
Quimiocinas	
SDF-1-3'A *	Homocigosis podría estar asociada con una progresión retardada de la enfermedad.
Otros Factores Genéticos	
Alelos HLA	Ciertos alelos están asociados con diferentes susceptibilidades a la infección y progresión de la enfermedad.
IL10 -5'A	Acelera la progresión a SIDA

* SDF-1 Stromal cell derived Factor - 1.

3.3.1 Células Dendríticas

Junto con células B y Macrófagos, las células dendríticas son las principales células que reportan antígenos. Las células dendríticas son quienes se encuentran con mayor facilidad en la periferia del sistema circulatorio y entre el tracto respiratorio, tejido mucoso del intestino y piel, es por esto que son éstas células de las primeras en tener contacto directo con VIH (55, 56). La función de estas células es tomar antígenos extraños y posteriormente los llevan a los tejidos linfoides en donde activan células T específicas contra el antígeno que ellas presentan.

Las células de Langerhans son células dendríticas inmaduras que solo tienen capacidad para tomar antígenos extraños (57).

3.3.2 Interacción CD y células B/T

Como las células dendríticas (CD) toman antígenos y los presentan en el tejido linfóide, las células B son activadas directamente por la presentación del antígeno mediante la unión a un receptor en la célula B (58).

En cambio, las células T para ser activadas necesitan del procesamiento por parte de la célula dendrítica, esta presenta péptidos antigénicos a la célula T con lo cual esta puede activarse por medio de un receptor T que se enlaza a este péptido:

- moléculas MHC clase I se expresan sobre la superficie de células dendríticas para la activación de células T CD8 o al péptido; (59).
- moléculas MHC clase II, para activar CD4+ T (60, 61).

Las CD también activan células T mediante citocinas como IL-12 que activan células T_H1 (una variedad de células T que se explicará posteriormente) y células Natural Killer (NK) (62).

Las células dendríticas producen un lectina tipo C como “SEÑAL” que promueve el enganche de las células T, esta “SEÑAL” es producida para la mayoría de los Lentivirus y también se adhiere a VIH por medio de la interacción directa de gp120 con carbohidratos de la lectina.

Cuando la célula dendrítica lleva VIH-1 consigo al tejido linfoide que es donde se produce la activación de los linfocitos, VIH puede infectar todas las células TCD4+ residentes.

3.3.3 Tejido Linfático como sitio de replicación viral

Una vez el virus queda atrapado por las células dendríticas foliculares y el tejido linfoide, éste ha garantizado su reservorio permanente de infección.

Durante la fase primaria de la infección, VIH se replica rápidamente teniendo como objetivo principal a Macrófagos y células TCD4+, el cuerpo tarda unos días en presentar su primera reacción inmune, pero para entonces el virus ya se ha radicado en el tejido linfoide, el cual será su principal sitio de replicación. La presencia de viriones en las células dendríticas foliculares y la producción de citocinas como IL-1, IL-6 y TNF α (Tumor Necrosis Factor alfa) inducen NF κ B (Nuclear Factor kappa B) el cual se enlaza al LTR de VIH-1 (ver secciones del genoma viral) para promover la transcripción viral (65- 70).

Se ha demostrado que los pacientes que reciben tratamiento retroviral temprano disminuyen el potencial de producción de virus en el tejido linfóide, teniendo como resultado un descenso dramático de carga viral en el plasma y además una progresión mucho más lenta de la destrucción del tejido linfóide (71- 73).

3.3.4 El sistema HLA y la respuesta inmune a VIH

Como se explicó el Complejo de Histocompatibilidad Mayor (MHC) son el grupo de genes que generan Antígenos Leucocíticos Humanos (HLA).

MHC-I genera moléculas de reconocimiento HLA para todas las células nucleadas. MHC-II genera moléculas de reconocimiento HLA para las células del sistema inmune particularmente.

MHC-I genera tres loci: A, B y C, y cada loci tiene varios alelos diferentes y tienen una parte derivada de la herencia genética.

MHC-II genera tres loci humanos: DR, DP y DQ y cada uno tiene secciones α y β .

Células T CD8⁺ reconocen sus péptidos (antigénicos) en contexto con las moléculas HLA clase I que encuentran sobre las células presentadoras de antígeno, a su vez las células T CD4⁺ requieren la presentación de péptidos antigénicos relativos a moléculas MHC clase II.

Las moléculas MHC clase I presentes en células T CD8⁺ están directamente relacionadas con el tiempo de desarrollo a SIDA en los pacientes infectados. Estudios recientes han demostrado que HLA B14, B27, B51, B57 Y C8 están

asociados con un lento desarrollo de la enfermedad, mientras que HLA A23, B37 y B49 están asociados con un rápido desarrollo de la enfermedad (74).

Al parecer las familias de HLA como B57 tienen una acción directa contra péptidos de VIH, puesto que cuando están presentes estas moléculas, las células citotóxicas controlan mejor la relación de carga viral en el plasma sanguíneo, por lo cual el virus se ve forzado a mutar en gag para evadir la respuesta de las células citotóxicas (75, 76, 186).

La actividad de NK también ha sido reportada como regulada por receptores KIR (MHC clase I - Killer cell Immunoglobulin like Receptors), por lo que la actividad de células NK indica una relevante función en la inmunidad VIH (77- 78).

Por otra parte las células T CD4+ juegan un rol preponderante en la activación de una respuesta inmune específica a través del reconocimiento de los péptidos antigénicos MHC clase II, al parecer la identificación de alelos favorables y desfavorables de MHC clase II es menos eficiente que la identificación de MHC clase I (79).

3.3.5 La respuesta inmune celular VIH-específica

Las células citotóxicas están diseñadas para reconocer células infectadas por virus, estas son las células que se encargan de la protección durante la infección primaria, actualmente se desarrollan investigaciones que comprueben la relación que existe entre una progresión lenta y una rápida de la enfermedad. Hasta ahora, se ha evidenciado que esto es relativo a la capacidad de reconocimiento o desconocimiento de los alelos HLA (80- 81).

En un principio el virus comienza a ser destruido por las células citotóxicas específicas. En pacientes que se encuentran en la infección primaria el nivel de células citotóxicas es altísimo, y está relacionado con el descenso brusco del virus en la sangre. Sin embargo, el virus realiza mutaciones de escape y cambia sus alelos de reconocimiento (cambio en epítomos específicos del HLA como B27 que se explicó anteriormente). Estas mutaciones están relacionadas con la progresión de la enfermedad, a más temprana mutación, más temprano será el desarrollo a SIDA.

Esto se encuentra ligado con las cepas presentes en la infección primaria (cepa R5), lo cual indica una movilidad del tropismo viral en su habilidad para infectar células T, puesto que en la fase primaria y crónica de la enfermedad se producen en alto número la cepa R5 que infecta CD, macrófagos y células T que expresan en alto porcentaje el correceptor CCR5 y en bajo porcentaje CXCR4, (83, 84) probablemente por el hecho de que éstas células son las que se encuentran presentes en forma abundante en los genitales, tejido linfoide e intestino, desarrollando con gran éxito su infección. En esta fase el cuerpo presenta la quimiocina SDF-1 que reprime la replicación de la cepa X4.

En la fase tardía aparece la cepa X4 replicándose exitosamente contra linfocitos T CD4+ provocando una pérdida abrupta de los mismos (85).

Al cambiar de objetivo primario (replicando cepas X4 y no R5) el virus no sólo evade las respuesta inmune MHC clase II, sino que también se comporta de forma estratégica puesto que, los pacientes con enfermedad avanzada (que han

superado la infección primaria), empiezan a perder rápidamente linfocitos TCD4 y con esto capacidad para activar una respuesta inmune específica.

Las células citotóxicas remarcan su habilidad destructora específica, por la habilidad de producir interferones γ y FNT α .

Otro factor asociado a la infección por VIH es la alta presencia de receptores PD-1 en células T CD4 y CD8, y del CTLA-4 sobre las células T CD4 específicas de VIH-1 están ligadas a una disfunción inmune reversible, por la disminución de las citocinas, que están relacionadas con la producción de células T CD8. Traumann (2006) demostró que bloqueando la vía de los receptores PD-1 en ratones, se elevaba la producción de células TCD8, quimiocinas y citocinas, obteniendo como resultado una disminución de virus de coriomeningitis linfocítica (86, 87).

Además, la proteína *nef* puede regular los antígenos HLA clase I y contraatacar provocando respuesta de reconocimiento de las células citotóxicas específicas.

Particularmente las células citotóxicas de pacientes con VIH-1 presentan una capa de perforina y un fenotipo inmaduro (88, 89).

Las células T CD8 también pueden ser infectadas (90), aunque no se sabe si también las células T CD8 VIH-1 específicas. No está claro en qué momento células T CD8 expresan el receptor CD4, ni las quimiocinas responsables de la activación, tampoco los correceptores utilizados por VIH-1 en estas células (90, 91).

3.3.6 La respuesta inmune T_H1/T_H2

Según la síntesis de citocinas, las células T CD4⁺ pueden ser T_H1 o T_H2 . Las células T CD4⁺ T_H1 producen interleucina-2 (IL-2) e interferones gama (IFN γ), los cuales representan las citocinas que soportan las funciones efectoras del sistema inmune (células citotóxicas, Natural Killers, macrófagos) (92).

Células T CD4⁺ T_H2 producen principalmente IL-4, IL-10, IL-5 e IL-6, las cuales favorecen el desarrollo de respuesta inmune humoral. Aunque la secreción de interleucinas no necesariamente está ligada a la presencia de virus, bien se ha demostrado su presencia como reacción a otras partículas extrañas.

3.3.7 Respuesta inmune humoral específica a VIH-1

La inmunidad humoral que es la primera respuesta del cuerpo contra un antígeno, se basa en el ataque al antígeno no por células de defensa, sino por anticuerpos secretados por estas células. Son las células B quienes se encargan de esta primera reacción, pero para ser activadas necesitan unirse a linfocitos T específicos que reclutan a la célula B mediante el intercambio de citocinas. Posteriormente las células B, hábiles para producir anticuerpos IgM, maduran desarrollando éstas capacidad para atacar directamente al antígeno, diferenciándose entonces de las otras células B. Las células B remanentes serán las células B de memoria.

Se ha demostrado que existen individuos expuestos no-infectados por VIH-1, y el factor común en éstos es la presencia de una fuerte respuesta humoral, como

anticuerpos anti-p24, persistencia de anticuerpos neutralizantes contra virus primarios y antólogos, y un vasto componente de anticuerpos de los epítomos gp120 (93, 94).

Un problema es la resistencia desarrollada por los virus, así que para el tiempo que tarda el cuerpo en desarrollar y expandir un anticuerpo específico, VIH generalmente ya ha creado una consecuente respuesta para evadir el ataque.

Otros estudios muy interesantes han demostrado la presencia en la mucosa de algunos pacientes en la cual prevalecen anticuerpos específicos contra el VIH no como IgG sistémica, sino IgA, consecuentemente VIH no infecta exitosamente al individuo. La presencia de IgA en la mucosa de prostitutas seropositivas de Kenya demostró que 76% no se infectó con VIH-1 a pesar de haber entrado en contacto con individuos infectados, el otro 24% de las mujeres seropositivas expuestas no reportó el anticuerpo IgA. Sin embargo estudios *in vitro* demostraron que a pesar de la presencia de IgA puede ocurrir infección, lo que supone que debe haber otros factores en los individuos seropositivos que previno su infección. Además los estudios directos de IgG e IgA específicos en mucosas vaginales no mostraron una relación directa de inhibición en la replicación del virus (95- 97).

Tabla No.5

Asociación de la HLA con Resistencia y-o Progresión de la Enfermedad por el VIH

Progresores Rápidos:

A1, A9, A11, A23, A24, A28+ TAP2.3, A29A TAP2.2, B8+ DR3, B35+ cw4, DR2, DR5.

Progresores Lentos y LTNP (No Progresor a Largo Plazo):

A9, A25+ TAP2.1, A26, A22, B5, B14, B18, B27, B57, Bw4, DR5, DR6, DR7, DRB1*0702+DQA1*0201, DR13,

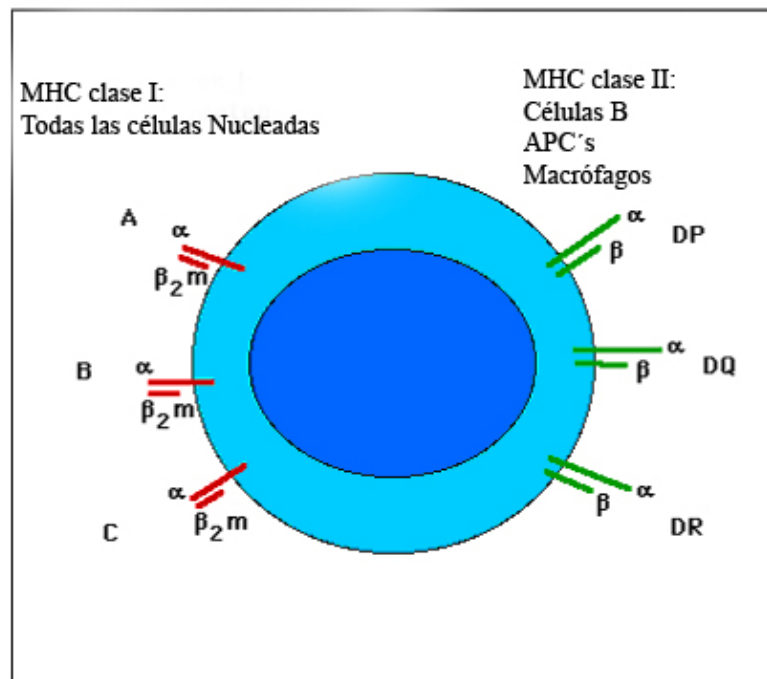
ENI (Expuestos y No Infeccionados)

A2, A28, DR13

Datos aportados por Westby *et al* (1996) (98).

Gráfica No.4

Esquema de Moléculas clase I y clase II del MHC



APC: Célula presentadora de antígeno.

Gráfico extraído y traducido de Ibarra (2004) (25).

3.3.8 Componentes Solubles Anti VIH de la Inmunidad Innata

Lectinas Unidas a Manosa (MLB^p): su función es unirse al VIH con el fin de lisarlo, provocando su inactivación y su facilidad para fagocitarlo (99).

Proteínas del Sistema de Complemento (C): sirven como opsonina para la fagocitosis del virus y también sirve como inactivador.

Secreción de Quimiocinas Contra VIH: quimiocinas SDF-1, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β son las responsables de interferir *in vitro* con la entrada de VIH. El mecanismo utilizado es el bloqueo de los correceptores CXCR4 y CCR5 que como son fundamentales para la entrada del virus.

En el caso de SDF-1 (CXCL12) ocasiona inhibición por impedimento estérico al entrar en competencia con gp120 de VIH-1, pues este es el ligando natural de CXCR4. El ligando natural de CCR5 es CCL5 (RANTES) y una vez unido a CCR5 esconde el correceptor por internalización en la membrana (24, 100, 101).

Citocinas: responsables de la comunicación célula - célula durante la infección de un hospedero. Regulan la intensidad y duración de la respuesta inmune.

Interferones: son tipos de proteínas de la clase de glicoproteínas como citocinas. Su mecanismo de acción es una respuesta de las células que han sido infectadas.

^p MLB^s abreviatura del ingles Mannose Binding Lectins.

Existen tres tipos de interferones Alfa, gamma, lambda, de los cuales el alfa es el más amplio con catorce isoformas diferentes, y para ejemplificar la forma en que actúan los interferones se detalla el mecanismo de acción de interferones alfa: estos son secretados por las células infectadas por virus, recibidos por receptores específicos en células sanas, cuya señal viaja al núcleo donde se activan la reproducción de proteínas específicas indicadas por el interferón. Regularmente estas proteínas tienen como objeto detener la replicación del virus una vez que éste entra en la célula. Para conseguirlo puede ocurrir de dos maneras, una es induciendo la muerte de la célula que ha sido infectada, la otra es generando proteínas que bloqueen la replicación del virus cuando la célula sana es infectada. Sin embargo la respuesta de los virus ante los interferones en varios casos es liberar proteínas que neutralizan a estos.

Otras de las reacciones generadas por interferones son:

- Apoptosis (inducción de la muerte celular programada o “suicidio celular”).
- Activación de células Natural Killers.
- Simulación de moléculas MHC clase I sobre la membrana de células T.

Los interferones fueron descubiertos en 1957, y hasta 1980 se empezaron a producir de forma accesible mediante recombinación de ADN en bacterias, lo que ha hecho posible su utilización en el tratamiento de algunas enfermedades como la esclerosis. Tienen efectos secundarios que semejan el catarro (27, 102- 104).

Proteínas APOBEC3 (Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3 proteins): enzimas generadas contra retro virus por humanos y animales, son parte del Sistema Inmune Innato, como un tipo de interferón que

puede interferir con la replicación de VIH. Lo hacen por inducción de la degradación de deoxicitidina a deoxiuridina durante la transcripción reversa.

Existen dos tipos activos de APOBEC3 contra VIH-1: APOBEC3F y APOBEC3G los cuales se incorporan dentro de los viriones durante el ensamblaje de los mismos y se activan durante la mencionada transcripción. A su vez, APOBEC3 es la enzima sobre la cual actúa la proteína Vif de VIH-1 generada con el propósito exclusivo de neutralizar APOBEC3F (105- 108).

3.4 Descripción del Virus

3.4.1 Estructura del Virión

El VIH es de la familia de los lentivirus de los Retrovirus. El virión mide unos 80-100nm y es de forma icosaédrica. Su estructura está compuesta de una membrana de envoltura y una nucleocápside (109- 111).

En la membrana de envoltura se encuentra la glicoproteína (gp) 120. Esta es una gp extra membrana que se encuentra unida en realidad a gp41. La que a su vez gp41 está inserta en la membrana bilipídica y la atraviesa. El C terminal de gp41 está unido a la matriz interna del virión (112).

Gp160 es parte de la membrana que da estructura al virión, es la proteína que se forma por el gen *env* y da origen a gp120 y gp41. Se compone de 72 complejos glucoproteicos constituidos cada uno por trímeros de *env* gp; su estructura se forma en la membrana de la célula huésped, la cual durante la replicación del

virus, se modifica integrando a gp160 formando gp41 y gp120. Además, en la membrana del virión se encuentran frecuentemente otras proteínas, y azúcares pertenecientes al huésped que le dio origen (113- 114).

En la parte interna del virión se encuentra la Proteína Asociada de Membrana que es la Matriz (proteína 17 o p17) donde se encuentra la cápside^z que está formada por p24 contiene a su vez dos hebras de ARN idénticas, un primer de ARN y algunas enzimas primordiales para la replicación: Proteasa (PR), Transcriptasa Reversa (TR), Integrasa (IN), ARNasa H (24, 25, 115).

3.4.2 Estructura Genómica

VIH puede estar en dos formas, una extracelular que se conoce como virión, y una intracelular que se conoce como provirus.

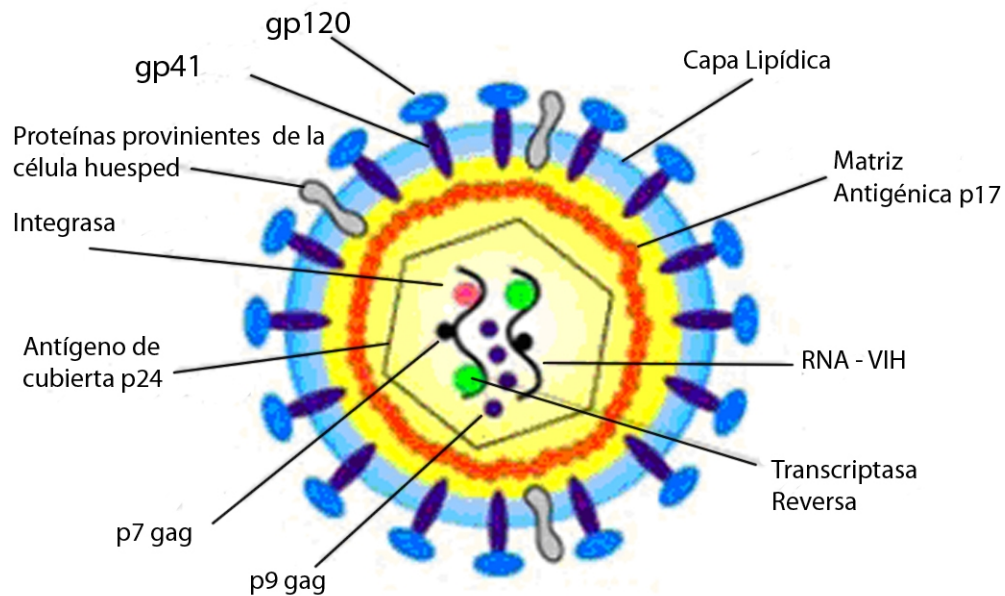
El genoma del virión se caracteriza por ser dos hebras idénticas de ARN, mientras que cuando es provirus, se identifican dos cadenas de ADN integradas en el genoma celular. Dichas cadenas se ven rodeadas por repeticiones terminales largas.

Los genes codificadores de proteínas se dividen a su vez en:

- Estructurales
- Reguladores
- Accesorios o auxiliares

^zCápside: traducción del inglés asignada al termino *core shell*.

Gráfica No.5



Estructura de VIH

Estructura genética:

El gen gag^{*k}:

Codifica precursores para las proteínas de la cápside del virión: matriz, cápside, p2, nucleocápside, p1 and p6.

El gen pol^r:

Codifica precursores para distintas enzimas como:

Proteasa (PR)

Retrotranscriptasa (RT)

RNasa H

Integrasa (IN)

El gen env³:

^{*k} gag: abreviatura del anglo *group specific antigen*

^r pol: abreviatura del anglo *polymerase*.

³ env: abreviatura del anglo *envelope*.

Codifica precursores para proteínas de envoltura:

gp41

gp120

Genes Reguladores:

Transactivador transcripcional (tat)

Regulador de la expresión viral (rev)

La función de estos genes es codificar proteínas que sirven durante la replicación del virus en la célula y no aparecen en el virión (al igual que nef que se explica más adelante).

Genes Accesorios o Auxiliares[£]:

Para una replicación *in Vitro* estos genes no son necesarios, pero para una replicación *in Vivo* determinan la patogenicidad, ellos son:

- vif
- vpr
- vpu
- nef

Secuencias No Codificadoras:

R Repetir secuencia.

U3 Secuencia Única a 3' fin del genoma

U5 Secuencia Única a 5' fin del genoma

[£] Genes Auxiliares: Sus nombres provienen de las siguientes abreviaturas del anglo: Vif: virion infectivity factor; vpr: viral protein R; vpu: viral protein U; nef: negative regulatory factor.

Dominios a 5' fin del genoma:

TAR elemento de respuesta trans - activante

Poly-A señal de poliadenilación

PBS Sitio del enlace del primer

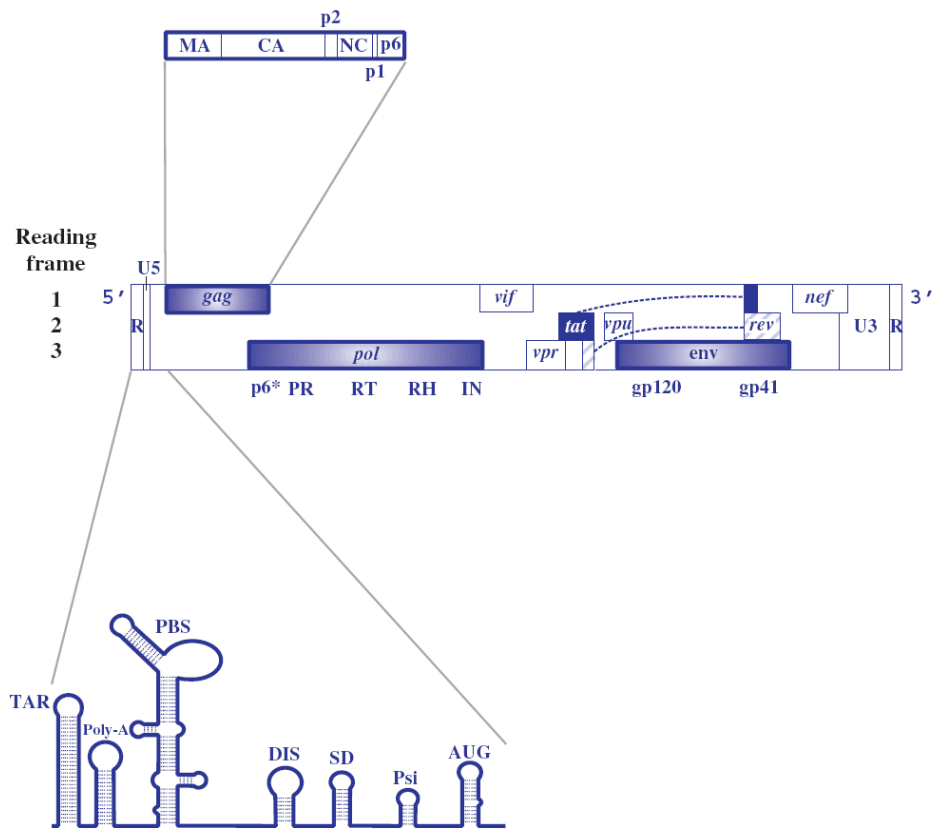
DIS Sitio de inicio de dimerización (Implicado en la formación del segmento del complejo de contacto)

SD Sitio donante del empalme

Psi (Ψ) Parte principal de la señal de empaque

AUG Comenzar codón del gen gag.

Gráfica No. 6



Esquema estructural genético de VIH (116- 119, 186).

3.5 Descripción del Ciclo de Replicación del Virus

Dentro del ciclo de replicación del VIH se pueden distinguir varias fases: A) adherencia, fusión e internalización del virión, B) transcripción inversa e integración, latencia, expresión temprana de genes reguladores, C) expresión tardía de genes estructurales y enzimáticos, D) morfogénesis y salida del virión.

Una vez el virus VIH-1 se ha introducido en el sistema sanguíneo por cualquiera de los mecanismos de infección, el ciclo de activación comienza la fase inicial una vez que este se encuentra con cualquier tipo de célula que exprese en su superficie el antígeno CD4 que es una inmunoglobulina de 55 KD extramembrana, presente principalmente en linfocitos T CD4 pero también en células dendríticas, macrófagos, monocitos, células de microglia y células de Langerhans, de la mucosa rectal, vaginal e intestinal (27, 112, 120, 121).

Sin embargo, el virus necesita además de CD4 a otro correceptor, que en general debe tener siete dominios de transmembrana, de los cuales los más comunes son las familias CC y CXCR, particularmente CCR5 y CXCR4. Las diferentes cepas discriminan entre diferentes correceptores, todas infectan células T de memoria y todas excepto R5 infectan células nativas T:

- **Cepa R5 utiliza CCR5** (M- trópico o monocitotrópico o No Inductores de Sincitios -NSI-)
- **Cepa X4 utiliza CXCR4** (T- trópicos o células T trópico o Inductores de Sincitios -SI)
- **Cepa R5X4 utiliza ambos** (Dual trópicos)

De cualquier manera la nomenclatura M, T y dual trópico se volvió confusa cuando se demostró que M-trópicos algunas veces infectaba T-trópicos y formaba sincitios. Además otros correceptores (con no tanta preeminencia) han sido reportados por otros autores: CCR3, CCR2, CCR8, CCR9, STRL33 (124-126), Gpr 15, Gpr 1, APJ y ChemR23, fueron identificados como utilizados por algunos VIH aislados (122, 123). Otros reportes extraordinarios relatan infecciones en células en ausencia de CD4 y en células CD8+ (127).

Al contactar gp120 con CD4 ocurren cambios dramáticos en la estructura conformacional de gp120 para dar paso a la reacción del segmento V3 en gp120 con el correceptor respectivo; inmediatamente se descubre gp41 que es una proteína extracelular de VIH que se encuentra debajo de gp120 y que es la encargada de cambiar la estructura insertando gp41 su NH₂ terminal de su sección T20 en la membrana celular de la célula atacada. Aquí ha comenzado la fijación y lo que ocurre a continuación es la fusión de la membrana viral y del huésped para que el virus pueda inyectar inmediatamente la cápside en la célula, incluyendo vpr, RT, IN.

Una vez dentro la Transcriptasa Reversa (enzima celular) se crea a partir del tRNA^{lys-3} viral una copia de ADN, formándose un híbrido ADN/ARN, posterior a lo cual el ARN se degenera y el ADN fabrica su segunda hebra (128- 129).

Continúa la inserción del ADN proviral en el interior del núcleo, en dicha inserción interviene la integrasa y como parte del complejo de pre - integración: vpr e IN (130- 131).

Una vez inserto el ADN viral en el ADN celular, ha adquirido su forma provirus, esta es la forma latente de virus que sirve como importante reservorio de la enfermedad, en determinado momento este ADN busca la replicación donde interviene pol (polimerasa) cuyas enzimas se encargan de producir mARN viral que viene del ADN proviral. En la primera fase se sintetizan las proteínas Tat, Rev y Nef, que inicialmente se creyó que eran inhibidores de la replicación, pero posteriormente se encontró que eran simuladores de la replicación.

Nef reduce la expresión de CD4 eliminando la vía de producción de éste y además elimina todas las expresiones de proteínas MHC clase I y clase II presentes en la membrana (132- 135). Estos cambios permiten a la célula infectada no ser destruida por el sistema inmune.

Tat y Rev a su vez funcionan como ordenadores de la transcripción de las proteínas del virión por lo que son parte de las proteínas sintetizadas en la fase temprana de la replicación (136- 139).

En la segunda fase (o fase tardía) se sintetizan las proteínas que irán dentro de la envoltura de la cápside viral: Gag, Pol y Env, el ARN del virión será el mismo que se usó para la fabricación de las proteínas.

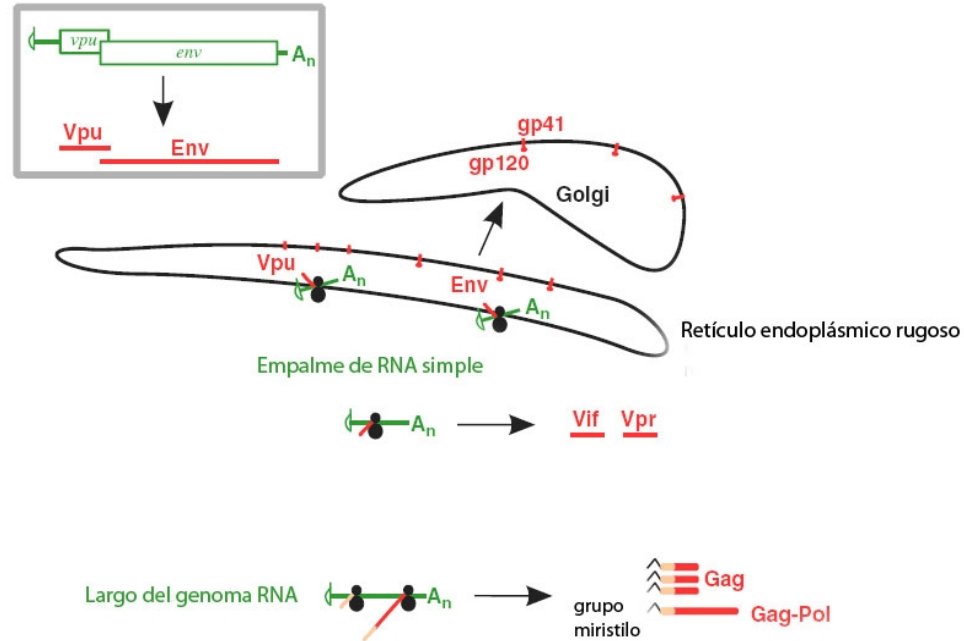
Gag y Pol, (genes precursores de la cápside, MA, p6, etc.) son enviadas a los ribosomas para su replicación, lo cual resulta en poliproteínas que deben ser cortadas aún en fragmentos (140- 142).

Env y vpu son trasladadas al retículo endoplásmico, donde trímeros de env se glicosilan altamente hasta alcanzar unos 160 KD, éstos trímeros se envían al aparato de Golgi donde formarán gp41 y gp120, el enganche es llevado a cabo por la furina, una proteasa que se encuentra en el mismo aparato de Golgi.

Vpu servirá para realzar las partículas virales en la membrana plasmática así que después de ser replicado en el retículo endoplásmico, viaja a la membrana citoplásmica y ayudará también a eliminar la expresión CD4 de la superficie de membrana (143- 144).

Las proteínas virales restantes (Vif, Vpr, Vpu y Env) son traducidas sobre ribosomas libres, Vif y Vpr desde ARNs simple traslapado.

Gráfica No. 7



Expresión tardía de los genes de HIV-1. Vpu y Env son trasladados de un hebra simple de RNA en el retículo endoplásmico. Las regiones insertas muestran el traslado de Vpu y Env de un mRNA bicistriónico. Env es sintetizado cuando el codón vpu comienza a ser leído durante el escaneo. Las proteínas remanentes son trasladadas sobre los ribosomas libres: Vif y Vpr son empalmes simples de RNA y Gag y Gag-Pol son empalmados del RNAs genómico largo.

Posterior a la fabricación del material progenie viral solamente falta el ensamble, el cual ocurre en el mismo citoplasma, los ARNs progenie y el t-ARN^{lys-3} se unen, a lo cual siguen Nef, gag y gag-Pol con extremos de grupos miristilo que provocan el enganche a la membrana citoplásmica que ya ha sido preparada con Vpu, y las proteínas de Env. Vif se une a la proteína APOBEC3 previniendo su intromisión en el virión, APOBEC3 es secretada por la célula hospedera con el objetivo de eliminar la replicación del virus provocando la descomposición del mismo. Parte de Vif se incorpora en el virión (145- 146).

El nuevo virión se envuelve entonces en la membrana citoplásmica preparada dañando la célula hospedero, por lo que la salida del resto de viriones terminará provocando la muerte de la célula (24,25, 147- 148).

3.6 Interacción Primaria del VIH con un linfocito CD4

A continuación se explicará en detalle las secciones de gp120 en VIH que entran en contacto con CD4 desde el primer encuentro linfocito - virus hasta la fusión de las membranas de ambos.

Gp120 se compone de 5 regiones variables y 5 regiones constantes, de las cuales las regiones variables forman un segmento externo de gp120 mientras que las secciones constantes forman su núcleo (149).

Experimentos termodinámicos demuestran liberación de energía en el primer contacto de gp120 - CD4 y el 23 % de esta energía está asociada a la reacción que sufre la fenilalanina-43 de CD4 que queda inserta en la llamada cavidad *phe-43* y es al parecer el único aminoácido que se liga en esta cavidad. Éste espacio se forma al quedar cubierta una sección en CD4 por el dominio interno (formado por el sistema v1/v2) y la hoja puente en una secuencia de reacción rápida que precede a la lenta que se compone del subsiguiente reordenamiento estructural que se explicará a continuación. Cristalografía de rayos X muestra que la cavidad Phe-43 se adentra profundamente en gp120 y está llena de agua, y es el enlace principal de gp120 a CD4. Además Asp- 368 de gp120 forma un puente salino con Arg-59 de CD4 (150).

Kwong *et al.* y Madani *et al.* han demostrado que el encuentro de las secciones de gp120 y CD4 está guiado por fuerzas de Van Der Waals, enlaces de puente de hidrógeno y fuerzas electrostáticas, las cuales ubican las secciones de carga positiva de CD4 en sus regiones V1 y V2, con las secciones de carga negativa presentes en gp120 (151, 152).

Simultáneamente al contacto inicial de gp120, la sección $\beta 3 - \beta 5$ en el mismo gp120 comienza a ordenar su conformación estructural como un pivote de cadena que se extiende abriendo epítomos para el correceptor, CXCR5 o CCR4.

Se ha descrito que gp120 al desplegarse descubre epítomos CD4i (CD4 inducidos) en los cuales pueden reaccionar anticuerpos monoclonales específicos (MAb's ^δ). MAb's para epítomos en gp120 reportados son 17b, 48d, b12 y 2G12. Al mostrar estos epítomos también se realiza la exposición de las regiones V1V2 y V3, V3 es la región que entra en contacto con su correceptor, esto a su vez permite la exposición de la región HR1 en gp41 lo cual conlleva a la consecuente disociación entre gp120 y gp41.

Como se ha indicado, gp120 está conformado por dos dominios, uno interno y uno externo que está muy glicosilado, y se orientan ambos por una cadena cuádruple de hoja β que conforma la hoja de enlace, la cual está formada por dos horquillas¹ β : una es la base de los segmentos variables V1 V2 del dominio interno (que se conecta al correceptor) y la otra horquilla que se proyecta hacia el dominio externo (que se conecta al receptor CD4).

^δ MAb's: Abreviatura del inglés *Monoclonal Antibodies*.

¹ horquillas: traducción al español acuñada al termino inglés *harpin*.

3.6.1 Reacción de los correceptores

Una vez formado el complejo CD4-gp120, gp120 se arregla para entrar en contacto con el correceptor usando sus secciones V1/V2 (que son parte de la hoja β de enlace), C4 y V3 (153).

El correceptor que en su orden natural es un receptor de quimiocinas, está conformado por cuatro dominios de transmembrana y una sección N- terminal

El sistema V1/V2 en gp120 es necesario para el contacto de gp120 con el correceptor, pero es la sección V3 la que determina cual correceptor será utilizado y por ende el tipo de cepa VIH-1 R5 o X4 y la subfamilia se clasifica en base al uso del correceptor.

Para el virus R5 el dominio N-terminal y el segundo segmento extracelular (ECL2) del correceptor CCR5 son esenciales para su reconocimiento e interactúan con la corona del segmento V3. En cualquier caso para la cepa X4 solamente la sección ECL2 en CXCR4 parece ser esencial (154- 158).

Según el reporte de Chin-Chin Huang (2007) estudios por Resonancia Magnética Nuclear y Cristalografía de Rayos X identificaron una tirosina sulfatada en la región extremo N-terminal de CCR5 que resulta sumamente importante para el enlace de gp120, particularmente esta tirosina es extraña puesto que se trata de una tirosina O-sulfatada (tys) la cual es reconocida por la región V3 de gp120. En CCR5 los residuos de tirosinas están en posiciones 3, 10, 14 y 15 y pueden estar O-sulfatadas pero bastan los residuos sulfatados en 10 y 14 para facilitar dicha interacción.

El trabajo de Chin-Chin Huang también permitió observar que la reacción con el correceptor CCR5 toma lugar con un acercamiento a gp120 desde la misma cara que lo hace CD4 pero enlazándose a la región ortogonal al sincitio que toma CD4 mostrando la superficie de la hoja de enlace y el segmento V3, siendo los primeros residuos de CCR5 Ser7 y Pro8 en entrar en contacto con V3, provocando que en la hélice (residuos 9 al 15), Tys 10 interactúe con el núcleo (secciones constantes) de gp120 y forme puentes salinos con Arg 327 de gp120, Asp 11 de CCR5 en interacción iónica con Arg 440 de gp120, Tys 14 es completamente secuestrada para crear una grieta entre V3 y la hoja de enlace, y el anillo aromático de Tyr 15 actúa contra Ile 439 de gp120 de la hoja de enlace (159).

Otros trabajos que comprueban el papel de CCR5 durante la entrada del virus son el de Wu, La Rosa *et al.* (1997) y el de Melikyan *et al.* (2007) (160 -161).

Por otra parte V4 y V5 de gp120 entran en contacto con CD4 y generan también sincitios para anticuerpos, son regiones mucho más constantes que V3, hasta ahora se sabe que V3 es el sitio donde ocurre la clonación de R5 a X4 volviéndose hábil para la infección de macrófagos y es V3 quién provoca diferencias esenciales (aparte de gp41) entre los subtipos de VIH (162).

3.6.2 Arreglos del dominio interno:

Según Rits-Volloch el segmento $\beta 3$ - $\beta 5$ de gp120 ubicado entre V1/V2 y V3, está desordenado antes de unirse a CD4, y se ordena al contacto, antes está ligado a gp41 y posteriormente gp120 se desliga de él, $\beta 3$ - $\beta 5$ está conectado con el segmento C-C y HR1 de gp41 esta es la unión que existe entre gp120 y gp41 (153).

Rits-Volloch también demostró que eliminado la sección $\beta 3$ - $\beta 5$ se debilitaba el enlace CD4-gp120 y se bloqueaba la formación del epítipo MAb 17b por lo que probablemente también se bloquea la formación del sitio del correceptor.

Gp120 si interactúa con MAb b12 y 2G12 por lo que CD4 provoca arreglos en $\beta 3$ - $\beta 5$ y afecta a gp41 potenciando la fusión de la membrana (153).

3.6.3 Fusión de la membrana

Cambios en la estructura de gp41:

Hay serios cambios conformacionales en la glicoproteína gp41 que son iniciados una vez que el complejo gp120-CD4-correceptor se ha formado, pero antes se describirá la compleja estructura que conforma a gp41.

Se ha demostrado mediante cristalografía de Rayos X que gp41, está formada por una estructura de hélices en seis segmentos y que cada uno de estos segmentos están formados por una cola central enrollada comprendida por tres regiones HR1 paralelas en contra de las cuales hay tres regiones HR2 empacadas en orientación antiparalela altercadas unas contra las otras. Cada región HR1 finaliza en un segmento llamado Péptido de Fusión, este péptido a su vez termina en una región N-terminal. Por su parte la región HR2 termina en una región transmembrana C-terminal. Ambas regiones HR2 y HR1 están unidas por una región C - C (donde C significa cisteína) en un modelo no enlazado a la célula hospedera, este modelo fue propuesto por Chen *et al.* en 2005 (163).

El contacto del puente disulfuro en gp41 con gp120 ya había sido evaluado en estudios de mutagénesis por varios autores como Maerz *et al.* (2001), York *et al.* (2004) y Jacobs (2005) (164- 166).

Sunghwan *et al.* (2008) expresa en su trabajo que actualmente solo se conoce la conformación estructural exacta de gp41 en su estado post fusión, los demás estados se han demostrado a través de pruebas indirectas. Se sabe que este estado post fusión es precedido por una forma extendida (intermediaria de fusión) y antes por otra forma comprimida (prefusión), Sunghwan en su trabajo trata de encontrar la relación de las diferencias entre la forma post y prefusión de gp41, puesto que la forma post fusión es sumamente estable y sin embargo ambas son muy parecidas, creando la pregunta ¿Qué evita que la forma prefusión de HR1 y HR2 caiga en la estable forma de haz de seis post fusión? (167).

Sunghwan critica la falta de un claro entendimiento de la interacción entre gp41-gp120 y demuestra que las regiones V1/V2/V3 de gp120 no tienen importancia en la interacción con gp41, pero si la región C5 de gp120 que es estabilizada por la región C1 en gp120 también.

La dificultad de evaluar las características del complejo gp41 - gp120 tiene tres aspectos:

- 1- La fragilidad de la conformación nativa gp41 que inmediatamente busca la formación hélice de 6 (post fusión).
- 2- La naturaleza flexible de gp120 hace necesaria su remoción para análisis por Cristalografía de Rayos X.

3- La carencia de entendimiento de la interacción real gp41-gp120 debido a que los estudios por mutagénesis adulteran el estado nativo.

Sunghwan concluye que la región peptídica C es la que entra en contacto clave con la región C5 de gp120 manteniendo C5 secuestrada la región peptídica C, y la región del enlace disulfuro ayuda a estabilizar éste enlace, el cual (enlace disulfuro-región C5) se romperá por un reductor débil durante la formación del haz de 6 en la forma post fusión permitiendo desenlazarse C5 de la región peptídica C, terminando en la forma de post fusión (167).

En cuanto a la interacción del Péptido de Fusión (FP) se sabe que es poco soluble y que hasta la fecha existe una ausencia en sus estudios, igualmente es poco comprendida la acción de la región N-terminal y su camino durante los cambios conformacionales, solo se sabe que termina incrustada en la membrana celular, aunque en esta revisión se propone el modelo que desarrolló Colman *et al.* (2003) como mera referencia.

El otro contacto que tiene gp41 con gp120 es la región del péptido de fusión (que termina en la región N Terminal) de gp41 que está ubicada en una cavidad de alojamiento en gp120 y que al arreglarse gp120 durante la formación del complejo gp120 - CD4 - correceptor, se descubre para ensartarse en la membrana de la célula huésped. (Ver modelo propuesto por Colman *et al.* 2003) (168).

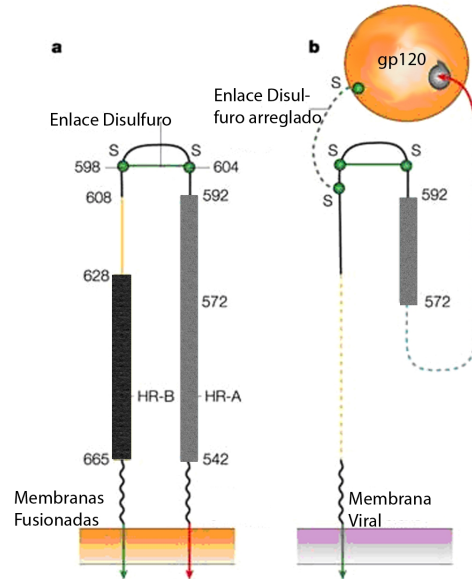
Al igual que todos los retrovirus VIH contiene en gp41 una estructura característica Cys-(X)₅₋₇-Cys donde X es una región de largo variable, y los aminoácidos Cys están unidos por puentes disulfuro. Este segmento también permite la orientación

reversa de la cadena, la cual es necesaria para compactar las hélices HR2 en el centro de la cola enrollada. Las dos hélices y los segmentos intermedios pueden ser vistos como una pinza, una punta es el péptido de fusión que se ensarta en la membrana de la célula objetivo. Todo esto concuerda con el papel que desempeñan muchos residuos en la estabilidad del complejo de superficie/trans membrana viral.

El actual modelo de fusión de membrana sugiere que la energía necesaria para la fusión de las membranas proviene del cambio conformacional que sufre gp41.

Es necesario decir que durante la presente revisión bibliográfica se encontraron varias propuestas que han tratado de explicar el mecanismo del cambio conformacional que sufre gp41, el cual es complejo, y el movimiento exacto de algunas partes aún permanecen sin esclarecer. Por ejemplo no se sabe cómo se forman los puentes de hidrógeno en las regiones N y C terminales con la cola central HR1 y HR2 antes detalladas (169- 171).

Gráfica No.8

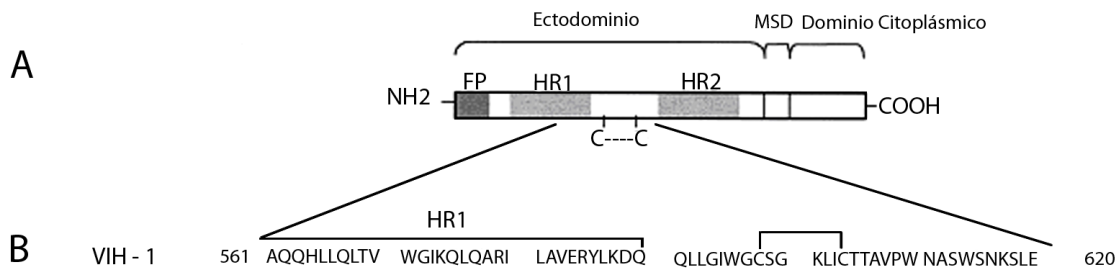


a- Una representación esquemática de la estructura de doble capa helicoidal de la glicoproteína gp41 presente en VIH, la gráfica fue obtenida del trabajo de Coleman *et al.* (2003) (168). Solamente es descrita una de las tres cadenas de la estructura quimérica. Rectángulos representan la hélices α . La capa interna de las varas está formada por tres copias de segmentos 542-592 (en gris), en la capa externa por los segmentos 608-665 (en negro). La estructura secundaria del segmento que forma la capa externa es una hebra β de los residuos 608-627 y la hélice α de los residuos 628 al 665. Las flechas verde y rojo representan el Péptido de Fusión y el anclaje trans membrana respectivamente. Obsérvese que en esta representación la membrana es la membrana fusionada virus-célula.

b- Una representación esquemática de un modelo propuesto para la estructura meta-estable “prefusión” de gp120-gp41. Solamente una de las tres cadenas del trímero es descrita. La construcción del enlace disulfuro es mostrada aquí como una línea punteada roja. La hélice de la capa central se propone que termina en la

glicina 572 y regresa a través del dominio gp120 donde el Péptido de fusión (residuo 512-527 en rojo) es inserto en una cavidad en la estructura trimérica de gp120. La séptima región repetida² que es la región de residuos 628-665 no está estructurada (línea punteada amarilla), pero es atada a la membrana de anclaje (residuos 684-705 en verde).

Gráfica No.9



A- Organización esquemática de la glicoproteína de transmembrana.

FP, Péptido de Fusión; HR1 y HR2, N- y C-terminal regiones hélice; C—C, Residuos Cys conservados con enlace disulfuro; MSD, dominio de abarcamiento de membrana.

B- Secuencia parcial de gp41 de VIH-1. Numeración correspondiente al precursor de VIH-1 Env (residuos iniciales de gp41 a posición 511).

Gráfica extraída de Bär and Allison (2003) (170).

Al disociarse gp120 de gp41, gp41 sufre cambios conformacionales, el dominio N-terminal de gp41 es expuesto mediante la extensión de HR1 y HR2 y es fijado a través del Péptido de Fusión en la membrana celular (y la región N-terminal), luego gp41 se arregla provocando la contracción de HR1 y HR2, formando un “haz de hélice de seis” estable, el cual es crítico para la fusión de las membranas celular y viral. De hecho, las propiedades antivirales de las secuencias aminoacídicas de

² séptima región repetida: traducción de *Heptead Region* por sus siglas inglesas HR.

HR1 y HR2 fueron tempranamente reconocidas en los 90, pues éste es el origen de Enfuvirtide, la primera droga antiviral usada (172).

Al formarse el haz de hélice de seis, este cambio de energía libre genera la fuerza necesaria para la formación del poro de fusión inter membranas. Seguidamente se expande dicho poro acuoso a través de las capas de ambas membranas, permitiendo la inyección de la cápside (168, 170, 171, 173).

Con la fusión de gp41, el correceptor y CD4 resultan en la neutralización del trímero de enlace gp (proteínas de cubierta), esto reduce los requerimientos y eficacia en el reconocimiento de anticuerpos neutralizantes haciendo efectiva la infección.

Otras formas de evadir la respuesta inmune por parte de las glicoproteínas de cubierta son una alta glicosilación, variabilidad en la secuencia y protección conformacional de epítomos envueltos en las proteínas de enlace de receptores (174). Por ejemplo Barouch *et al.* (2003) demostró que la cepa SHIV86.6P evadía una vacuna que induce inmunidad, por la mutación de un solo aminoácido en el epítomo CTL p-11 en gag (175).

La flexibilidad de la glicoproteína 120 es otro factor que impide a los anticuerpos específicos encontrar los epítomos importantes para la neutralización por lo que otras vacunas van buscando generar anticuerpos que hagan fija gp120 y así facilitar el trabajo inmune del cuerpo (26, 163, 173, 176).

3.7 Estudios Previos Sobre la Estructura de CD4

CD4^h es el receptor presente en los linfocitos T_h CD4⁺. Este al igual que todos los receptores T está encargado de repuestas a señales intracelulares, en este caso correspondientes al MHC II.

Entre otras funciones de este receptor se reconoce su interacción con moléculas de MHC clase II mediante células presentadoras de antígeno, activación de células T y enlace a una gama de anticuerpos (177). En este estudio se trata con interés prioritario las secciones que interaccionan con la glicoproteína gp120 de VIH.

3.7.1 Estructura General:

CD4 es una cadena simple de 55-kilodaltons con 372 aminoácidos en su dominio extracelular que está compuesto de cuatro inmunoglobulinas variables (V) intercaladas por cuatro regiones de unión (J), 23 aminoácidos en su dominio de transmembrana y 38 aminoácidos en el dominio citoplásmico.

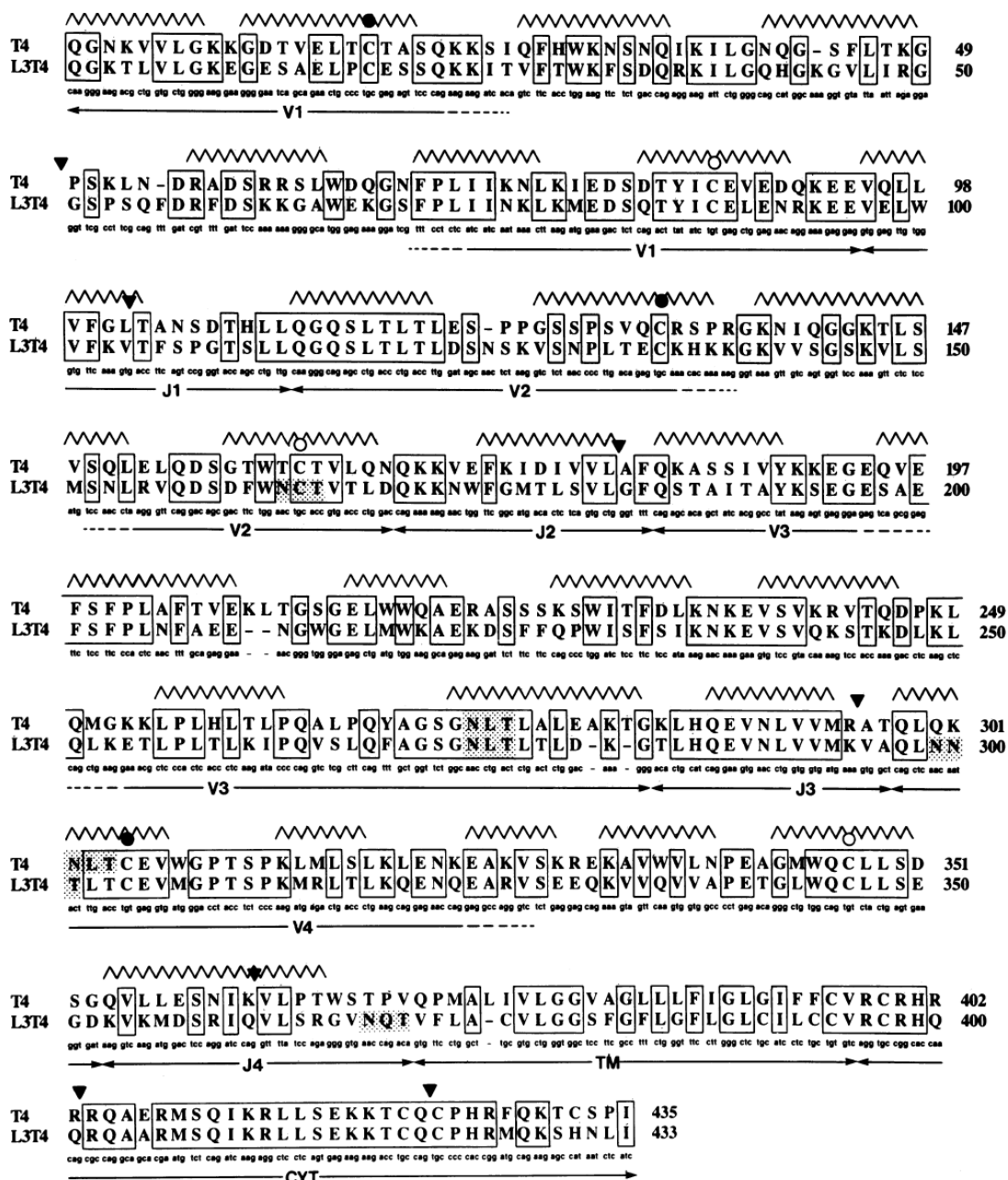
Las cuatro inmunoglobulinas variables están numeradas de 1 a 4 siendo 1 la más externa (de V1 a V4), además V1 está compuesta por tres regiones complementarias determinantes (CDR) (178).

En sí el orden estructural que presenta CD4, según fue descrito por Maddon *et al.* (1986, 1987) (179, 180) es: V1-J1-V2-J2-V3-J3-V4-J4-TM-CYT, donde TM

^h CD4: Cúmulo de diferenciación 4 o en inglés, cluster of differentiation.

significa proteína de membrana y CYT es la región citoplásmica (Gráfica No.10).

Gráfica No.10



Gráfica obtenida de Maddon *et al.* (1986) (179).

Gráfica No.10: esquema estructural del genoma de CD4: T4 secuencia aminoacídica de CD4 humano, L3T4 secuencia aminoacídica de CD4 de ratón. A la derecha se encuentra el número de posición del aminoácido. V son las regiones Variables, J son las regiones J de unión. Las flechas horizontales cercanas a L3T4 marcan las áreas comprendidas por cada región. Las 6 cisteínas están marcadas por círculos, la primera por uno negro, la segunda por uno blanco. Las secciones que forman conformaciones de cadena β están marcadas por líneas punteadas. Los intrones están marcados por triángulos negros, los sitios de glicosilación de enlace N están encerrados en secciones punteadas y las igualdades entre ambas secuencias están marcadas por cajas que las encierran a ambas.

3.7.2 Secciones Estructurales de CD4 que interactúan con gp120

La región V1 es suficiente para la interacción de gp120 de VIH con CD4, donde CDR2 es la región más activa en la fusión con gp120, pero no la única. Otros estudios como el de Broder y Berger (1993) demostraron que en la región CDR3, 9 de 30 aminoácidos mostraron una reacción adversa en la unión de CD4-gp120 por medio de estudios de mutagénesis llegando a la conclusión de que la región no era fundamental para la unión con gp120 pero sí probablemente para la estabilidad del arreglo conformacional posterior que sufre el complejo gp120-CD4 aunque no se han encontrado evidencias de esto en esta revisión (181).

Bowman *et al.* (1990) reconoce como importante la región de los residuos 42-55 que afectan el enlace con gp120 de VIH. Además las posiciones 29, 77-81 y 85 demuestran ser muy importantes en el análisis de escaneo por mutagénesis de alanina (177).

Brand, Srinivasan y Sodroski (1995) determinaron que la entrada de gp120 en CDR2 de CD4 es trascendente en los residuos 40-60 siendo de crítica importancia la fenilalanina-43, lisina 46 y arginina 59 (182).

Prabakaran *et al.* (2006) describe a CDR2 (llamado también H2) como una cadena altamente pesada que carece de puentes de hidrógeno observando el total de su estructura canónica. CDR3 por su parte como una estructura rígida de 17.5 amstrongs que forma una extensión de hoja β (183).

3.8 Estudios Previos Sobre la Estructura de gp120

3.8.1 Secciones Estructurales de gp120

gp120 se compone de 5 regiones variables y 5 regiones constantes, de las cuales las regiones variables forman un segmento externo de gp120 mientras que las secciones constantes forman su núcleo (149).

Gráfica No.11

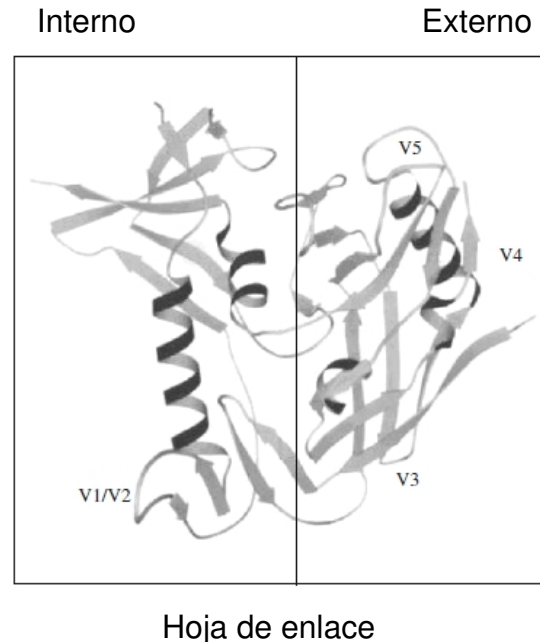


Representación esquemática del largo total de glicoproteína gp120. C significa región constante, V significa región variable.

Representación tridimensional de gp120

—Según Briz, *et al.* (2006) (154) —

Gráfica No.12



En la gráfica tridimensional de gp120 se aprecia del lado izquierdo la región interna de gp120, que está conformada por las regiones C1 y C2, una línea vertical parte la gráfica señalando la posición de la hoja de puente, la cual se compone de cuatro hebras que a menudo son llamadas pinzas³, estas pinzas están compuestas por las regiones V1 y V2 (que forman la hebra V1/V2) y por una parte de la región C2 que es vecina a V3 y es esta la pinza que se proyecta hacia la región externa donde se encuentran V4 y V5. Según Vasudha Sundaravaradan *et al.* (2007) las regiones que pueden ayudar al contacto con CD4 son V4 y V5.

³ pinzas: traducción del original en inglés para el término *harpins*, que por cuestiones ilustrativas se interpreta aquí como pinza y no como horquilla.

El segmento $\beta 3$ - $\beta 5$ se ubica contiguo a V1/V2 y se observa como una delgada hebra que se adentra en el dominio interno (no señalado).

Es importante recalcar que esta estructura gp120 se presenta como un trímero sobre gp41, y a su vez, gp41 está repetido tres veces y unido formando una especie de bastón en la punta del cual están sujetos 3 gp120 como lóbulos en cuya corona se ubica V3 y en la parte antónima soportando esta descripción, se encontraría C1 el cual como se explica en la interacción primaria de VIH con un linfocito CD4, debe estar en contacto C1 con la región CC de gp41.

3.8.2 Estructura de gp120

Bases de datos de estructuras gp120 (184). Véase sección Anexos.

3.9 Estructura del Correoceptor CXCR4

A continuación se enumeran estructuras reportadas por Uniprot⁹, del correoceptor CXCR4. Son identificadas dos isoformas de este correoceptor, aunque es posible que existan otras isoformas (187).

Uniprot es una base de datos universal con fines divulgativos por acuerdo entre el Instituto Europeo de Bioinformática (EBI), el Instituto Suizo de Bioinformática (SIB) y el Recurso de Información Proteica (PIR).

Isoforma 1 (Identificador: **P61073-1**)

Isoforma electa como la secuencia “canónica”. Toda la información posicional en estas entradas se refiere a esta. Esta también ha sido la secuencia que aparece en las versiones publicadas.

Isoforma 2 (Identificador: **P61073-2**)

También conocida como CXCR4-LO;

La secuencia de estas isoformas difieren de la secuencia canónica en lo siguiente:
Los aminoácidos 1-5 MEGIS cambian a MSIPLPLLQ.

⁹ Consultar referencias 187 y 188 para ver una revisión completa aportada por Uniprot, sobre los correoceptores CXCR4 y CCR5.

Isoforma 1:

10 20 30 40 50 60
 MEGISIYTSN NYTEEMGSGD YDSMKEPCFR EENANFNKIF LPTIYSIIFL TGIVGNGLVI

 70 80 90 100 110 120
 LVMGYQKKLR SMTDKYRLHL SVADLLFVIT LPFWAVDAVA NWYFGNFLCK AVHVIYTVNL

 130 140 150 160 170 180
 YSSVLILAFI SLDRYLAIVH ATNSQRPRKL LAEKVVYVGV WIPALLLTIP DFIFANVSEA

 190 200 210 220 230 240
 DDRYICDRFY PNDLWVVVFQ FQHIMVGLIL PGIVILSCYC IISKLSHSK GHQKRKALKT

 250 260 270 280 290 300
 TVILILAFFA CWLPYYIGIS IDSFILLEII KQGCEFENTV HKWISITEAL AFFHCLLNPI

 310 320 330 340 350
 LYAFLGAKFK TSAQHALTSV SRGSSLKILS KGKRGHSSV STESESSSFH SS

Isoforma 2:

10 20 30 40 50 60
 MSIPLLLQI YTSNRYTEEM GSGDYDSMKE PCFREANANF NKIFLPTIYS IIFLTGIVGN

 70 80 90 100 110 120
 GLVILVMGYQ KKLRSMTDKY RLHLSVADLL FVITLPFWAV DAVANWYFGN FLCKAVHVIY

 130 140 150 160 170 180
 TVNLYSSVLI LAFISLDRYL AIVHATNSQR PRKLLAEKVV YGVWIPALL LTIPDFIFAN

 190 200 210 220 230 240
 VSEADDRYIC DRFYPNDLWV VVFQFQHIMV GLILPGIVIL SCYCIISKL SHSKGHQKRK

 250 260 270 280 290 300
 ALKTTVILIL AFFACWLPYY IGISIDSFIL LEIKQGCEF ENTVHKWISI TEALAFFHCC

 310 320 330 340 350
 LNPILYAFLG AKFKTSAQHA LTSVSRGSSL KILSKGKRGG HSSVSTESSES SSFHSS

3.10 Estructura del Correceptor CCR5

A continuación se enumeran estructuras reportadas del correceptor CCR5 por Uniprot. Es posible que existan otras isoformas (188).

Código: P51681-1 [UniParc].

Ultima Modificación: Octubre 1, 1996. Versión 1. , Ultima revisión: 10 Junio de 2008

Checksum: 88ECE1F38E6D45A7

Largo: 352

Masa: (Da): 40,524

```

    10      20      30      40      50      60
MDYQVSSPIY DINYITSEPC QKINVKQIAA RLLPLYSLV FIFGFVGNML VILILINCKR

    70      80      90     100     110     120
LKSMTDIYLL NLAISDLFFL LTVPFWAHYA AAQWDFGNTM CQLLTGLYFI GFFSGIFFII

   130     140     150     160     170     180
LLTIDRYLAV VHAVFALKAR TVTFGVVTSV ITWVVAVFAS LPGIIFTRSQ KEGLHYTCSS

   190     200     210     220     230     240
HFPYSQYQFW KNFQTLKIVI LGLVLP LLVM VICYSGILKT LLRCRNEKKR HRAVRLIFTI

   250     260     270     280     290     300
MIVYFLFWAP YNIVLLLNTF QEFFGLNNCS SSNRLDQAMQ VTETLGMTHC CINPIYAFV

   310     320     330     340     350
GEKFRNYLLV FFQKHIAKRF CKCCSIFQGE APERASSVYT RSTGEQEISV GL

```

4. Justificación

El mundo entró en alerta ante el VIH cuando Estados Unidos e Inglaterra reportaron los primeros casos del Síndrome de Inmunodeficiencia Humana Adquirida en 1981. Un cuarto de siglo más tarde no existe cura ni una vacuna para los millones de habitantes infectados en el planeta. Las medicinas desarrolladas actualmente son anti - retrovirales que retardan el desarrollo de la enfermedad. Los anti - retrovirales presentan dos inconvenientes, el primero es su alto costo y el segundo es que de cualquier manera el paciente morirá. En Guatemala actualmente resulta sumamente difícil mantener el costo de los tratamientos anti - retrovirales, por lo que la mayoría de los pacientes son tratados con el mínimo de recursos que el sistema de salud pública les pueda brindar.

Por estos motivos, el hecho de que Guatemala pueda aspirar a desarrollar sus propias medicinas sin tener que comprar a empresas extranjeras los costosos rubros de medicina, da una oportunidad para invertir esta situación, pues no solo se invertiría en medicina preventiva que a largo plazo es mucho más económica, sino que brinda la oportunidad de comenzar a explotar el mercado de la medicina en el extranjero en vez de que ocurra lo contrario.

Por otra parte, muchos han sido los estudios acerca de la naturaleza del Virus de la Inmunodeficiencia Humana. El presente trabajo ubica los resultados obtenidos de estos estudios con un análisis profundo para generar conclusiones nuevas orientadas a explicar la naturaleza de VIH.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General:

Realizar una revisión general de las publicaciones sobre la interacción de linfocitos T CD4+ con el segmento V3 de la glicoproteína 120 presente en el Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 para explicar su interacción química.

5.2 Objetivos Específicos:

- 5.2.1 Encontrar el área específica en la que interacciona gp120 con el correceptor CCR5 de los linfocitos T_h CD4+.
- 5.2.2 Presentar un esquema estructural desarrollado y general del complejo CCR5, CD4 y gp120.
- 5.2.3 Explicar los mecanismos de interacción del segmento variable V3 de gp120 con el correceptor CCR5 de los linfocitos CD4.
- 5.2.4 Determinar factores comunes en los aminoácidos variables del segmento V3 en función de su interacción con los receptores CCR5 y CXCR4.
- 5.2.5 Explicar la estabilidad del producto de unión CCR5-gp120-CD4.

6. Hipótesis

Es posible encontrar las características químicas que justifican el mecanismo de reacción y el reconocimiento estructural que ejecuta la glicoproteína gp120 al reaccionar su sección V3 con el correceptor CCR5 de los linfocitos T_h CD4+.

7. Materiales y Métodos

7.1 Universo de trabajo:

Puesto que se trata de un estudio tipo meta - análisis, el universo de trabajo se conformó por toda aquella información acerca de la naturaleza inmunológica, bioquímica y química del VIH y su interacción con los linfocitos T CD4+. Por lo cual, los reportes, tesis, artículos científicos y bases de datos fueron discriminados con los criterios que se presentan en esta sección.

Los materiales y métodos utilizados en el estudio fueron los siguientes:

7.2 Materiales:

7.2.1 Investigaciones previas

Reportes, tesis, artículos científicos y bases de datos.

7.2.2 Hardware:

A- Procesador AMD Sempron 2800+ / 1000 Mb Ram / 256 Mb Nvidia GeForce FX 5500.

B- Procesador AMD Sempron 3400+ / 512 Mb Ram / 256 Mb Nvidia GeForce FX 5200 .

7.2.3 Software:

A-Linux Ubuntu 8.04 / Autodock 4.0 /Autodock Tools 4.01/Hex 5.0/UCFS Chimera 1.2540

B- Linux Slackware 12.01 /Autodock 4.0 /Autodock Tools 4.01/Hex 5.0/UCFS Chimera 1.2540

7.3 Métodos.

7.3.1 Criterios de inclusión y exclusión de artículos revisados.

Fueron seleccionados los artículos y la bibliografía según su importancia por:

Concepto: Caracterización estructural de aminoácidos relevantes (tanto de gp120 como de CD4 y los correceptores CXCR4 y CCR5).

Cronológico: Se priorizaron los estudios más recientes, puesto que el fin de esta investigación no es estadístico, se han incluyeron artículos de 1981 a 1997 con un carácter histórico, en algunos casos algunos conceptos anteriores a 2000 continúan vigentes (ver descripción de CD4 y gp120 y la sección Conceptos básicos de inmunología).

Según el tipo de información: Primaria (artículos que generan resultados con base en experimentos realizados por la misma institución (o grupo científico) que las analiza y reporta, en el caso de las secciones “Estudios previos sobre la estructura de gp120 y de CD4” se utilizaron bases de datos de reconocimiento internacional.

Fueron excluidas por tanto las investigaciones de tipo secundarias y terciarias: que son estudios realizados por aquellas instituciones o grupos que recopilan los análisis realizados por otras instituciones para presentarlos en compendios, resúmenes paráfrasis u otro tipo de interpretación que no sólo pueda alterar la información primaria, sino también que sesguen los resultados de laboratorio genuinamente obtenidos.

No fue el objetivo de este estudio obtener información con fines de comparación estadística, a excepción del planteamiento de la estructura básica de gp120 donde se utilizaron bancos de datos como fundamento para encontrar factores comunes de expresión en los aminoácidos del segmento V3. También en el caso de los correceptores, para lo cual se utilizaron estudios que demostraron obtener las estructuras por sus propios procedimientos de laboratorio, por lo cual estas fuentes de datos fueron consultados en artículos científicos mundialmente reconocidos por la misma comunidad científica.

Se observaron según el caso, aquellas estructuras proporcionadas por artículos científicos que reportaron mutaciones, supresiones o pérdida de aminoácidos según la importancia que tengan dichas alteraciones para los segmentos estudiados en este trabajo.

7.3.2 Método de Análisis Estructural Químico

La elucidación de los mecanismos de reacción planteados se hizo por medio de programas computacionales de tres dimensiones que permitieron un análisis exacto con archivos de tipo banco de dato proteico pdb (protein data bank), recopilados de la información brindada por los autores de artículos que generan estos archivos virtuales tridimensionales en base a estudios cristalográficos de

rayos X, y que se encuentran recopiladas en bases de datos como la Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) que es un grupo respaldado por Rutgers el cual es el departamento RCSB de la Universidad de New Jersey, el grupo RCSB-SDSC que está localizado en el Centro de Supercomputadoras de San Diego (SDSC), la Skaggs School de Farmacia y Ciencias Farmacéuticas (SSPPS) de la Universidad de California, San Diego (UCSD), y el grupo RCSB-BMRB que está localizado en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Wisconsin-Madison. También ha sido tomado en cuenta The World Wide Protein Data Bank que es el centro de depósito mundial de proceso y distribución de datos pdb (189), cuyo respaldo descansa en los grupos RCSB de Europa, Estados Unidos y Japón.

Los programas de estudio de estructuras biológicas macromoleculares utilizados para este estudio como Hex 5.0, Autodock y Chimera, fueron seleccionados por su reconocimiento en la exactitud de la descripción molecular en tres dimensiones de las nubes electrónicas que conforman cada uno de los átomos presentes en estas macromoléculas, esta descripción atómica está basada en la interpretación de algoritmos matemáticos que describen los orbitales moleculares mediante una malla electrónica virtual tridimensional, permitiendo predecir los cambios conformacionales del ligando y correceptor.

7.3.3 Procedimiento

7.3.3.1 Se seleccionaron los mejores archivos del complejo CD4-gp120 y de CCR5 en formato .pdb discriminados según los criterios previamente descritos.

Archivo 1OPW

La secuencia de HIV-1 utilizada fue la glicoproteína de cubierta gp120 cepa HXBc2 expresada en el archivo 1OPW.pdb extraído del sitio de internet de Proteín Data Bank. Este archivo muestra a gp120 en complejo con CD4 Humano y con CCR5 en el último estado del enlace CD4-gp120-CCR5. En este archivo no se ha publicado el segmento V3 de gp120 y CCR5 está unido a gp120 en una propuesta molecular teórica, cuyas coordenadas atómicas provienen de una evaluación por cristalografía de rayos X. En 1OPW.pdb las cadenas gp120 y CD4 fueron obtenidas del archivo 1G9M.pdb que presenta un complejo CD4-gp120-17B donde 17B es un anticuerpo monoclonal, y las coordenadas atómicas de este archivo han sido verificadas por medio de cristalografía de rayos X. Sin embargo 1OPW.pdb ha sido tratado según el mismo artículo de Liu S.Q. *et. al.*(2003) por simulación de movimiento molecular y enlace automatizado para representar este modelo teórico de enlace (190).

El tratamiento que se realizó en 1OPW.pdb consistió en eliminar la cadena de secuencia de CCR5 por medio del programa computacional Chimera, y se verificó posteriormente que no existieran partículas de agua o aminoácidos incoherentes en el complejo CD4-gp120 restante. Esto se hizo previo a la utilización de este complejo para correrlo en las secuencias de enlace computacional automatizado con el programa Autodock4.

Archivo CCR5

Para realizar las secuencias de enlace computacional automatizado se utilizó un segmento de CCR5, no CCR5 completo puesto que el programa Autodock 4.01

solamente permite el enlace un receptor-ligando donde el receptor puede ser cualquier macromolécula que no supere los 50,000 átomos, pero el ligando debe ser pequeño, con un máximo de 128 átomos; este máximo es extensible a cantidades mayores de átomos con la consecuencia de cargar excesivamente los cálculos computacionales que un ordenador AMD 3400+ Mhz puede realizar. Este fue el motivo por lo cual se utilizó el archivo 2RLL.pdb que es una secuencia corta de CCR5 Nt (7-15) (los aminoácidos 7-15 de la región N terminal que eventualmente también se expresa como CCR5₇₋₁₅ o simplemente CCR5 7-15). Además, la secuencia CCR5 7-15 es la que previamente se ha descrito como la región de interacción más importante en el correceptor CCR5 junto a su región extra celular ECL2, región que se detalla a continuación.

Archivo ECL2

Para evaluar las interacciones energéticas entre el segundo segmento extracelular de CCR5 que es llamado ECL2, fueron extraídos los aminoácidos 169 al 180 de la cadena CCR5 presente en el archivo 1OPW.pdb descrito previamente. Para eliminar los posibles errores de evaluación energética, se le asignó movimiento torsional aleatorio tanto a la cadena peptídica como a las cadenas laterales de ECL2 en un proceso que será detallado más adelante.

Archivo 2B4C

2B4C.pdb es otra representación de anticuerpo monoclonal unido al complejo gp120-CD4. La secuencia utilizada de gp120 de VIH-1 en este archivo pertenece a la cepa JR-FL que es una de las más comunes junto a la cepa HXBc2, se seleccionó este archivo por ser el único que incluía por completo el segmento V3 y

además, en estado no enlazado. El propio archivo 2BC4 es una representación teórica del enlace a un anticuerpo monoclonal. Las regiones de interés no han sido alteradas significativamente como lo describe este mismo archivo. Para el segmento V3 a continuación se detalla la diferencia entre cada cepa:

Tabla No. 6: Comparación entre las Cepas JRFL y HXBC2 en su región V3

Cepa	(Posición Inicial) Secuencia (Posición Final)
JR-FL	(296)CTRPNNNTRKSIHI- -GPGRAFYTGTGEIIGDIRQAHC (331)
HXBc2	(296)CTRPNNNTRKRIRIQRGPGRAFVTIGK-IGNMRQAHC (331)

Este archivo fue seleccionado puesto que sus coordenadas fueron obtenidas directamente por medio de difracción de rayos X en base a un cristal de complejo.

El tratamiento ejecutado a este archivo consistió en la eliminación de las cadenas H y L, siglas que representan las secuencias de las moléculas anti - VIH gp120 inmunoglobulinas X5 de cadena ligera y cadena pesada respectivamente, además fue eliminada la secuencia Het que comprende residuos proteicos presentes en el cristal analizado.

El nuevo archivo producto de este tratamiento fue nombrado gp120-CD4.pdb.

Archivo V3

El archivo gp120-CD4.pdb antes mencionado fue tomado y se sustrajo la sección V3, explícitamente los aminoácidos desde PRO299 hasta ARG327 de gp120 utilizando para ello el programa computacional Chimera ³ (191), y fue guardado como V3.pdb.

7.3.3.2 Se establecieron los puntos críticos de reacción según los archivos .pdb seleccionados en base a los estudios previos encontrados.

7.3.3.3 Se determinaron las regiones que intervienen entre gp120 y CCR5 por métodos de enlace computacional proteína-ligando, con el fin de describir la estructura del complejo CCR5-gp120-CD4.

Dicha determinación se realizó utilizando los archivos .pdb de CCR5 adquiridos y contruidos que reaccionaron como ligandos contra regiones específicas del enlace gp120-CD4, las cuales fueron preestablecidas por los datos que reporta la literatura.

Otro segmento importante que fue creado es el de la segunda región extracelular conocida como ECL2 la cual ha sido descrita como importante por su interacción con gp120. Este segmento ECL2 también es sometido al proceso de enlace automatizado en las regiones V3, V1/V2.

³Algunas imágenes de gráfica molecular fueron producidas utilizando el programa UCSF Chimera package de el Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics de la University of California, San Francisco (soportado por NIH P41 RR-01081).

Determinación de las Regiones de Reacción de CD4-gp120 y CCR5

Se realizó un total de ocho corridas por medio del programa computacional Autodock versión 4.01 (192) para determinar por medio de varias comparaciones en las energías de enlace determinadas por el programa, los aminoácidos que producían los complejos receptor-ligando más estables en función de las mayores energías de enlace liberadas.

Para realizar el enlace automatizado, los segmentos pdb construidos o adquiridos fueron sometidos a una malla electrónica tridimensional donde se se ubicó el receptor gp120-CD4. Para este caso en particular se creó un segmento de CCR5 que es la región N-terminal que comprende los primeros aminoácidos 7-15 de CCR5 que se hicieron reaccionar contra las regiones V3 y contra las regiones V1/V2 presentes en el complejo gp120-CD4.

Parámetros Utilizados en Cada Corrida:

- Número de corridas en Algoritmo Genético: 100
- Tamaño de la población: 150 individuos
- Máximo Número de Evaluaciones: 2.5 millones
- Número Máximo de Generaciones: 27,000
- Número máximo de individuos que sobreviven por cada corrida: 1
- Rango de mutaciones genéticas⁴: 0.02

⁴**Rango de mutación:** *Es un punto flotante desde 0 a 1, representando la probabilidad de que un gen particular sea mutado. Este parámetro generalmente es pequeño.*

- Rango de traslapes: 0.8
- Modo de algoritmo genético de traslape: twopt
- Número de generaciones de las cuales se escoge el peor individuo: 10

Los parámetros electos referentes a la probabilidad de mutación genética son bajos, puesto que Autodock los utiliza en caso de trabajar con secuencias de ADN o ARN, en este caso se disminuye tal probabilidad para poderlo aplicar sin problemas a secuencias proteicas.

7.3.3.4 Para conocer la orientación exacta de CCR5 respecto de gp120, los datos antes generados fueron comparados mediante las energías de enlace liberadas, que son calculadas por el mismo programa Autodock 4.01, es de esperar que las regiones más exitosas en el enlace posean las mayores liberaciones de energía y que por tanto se comportan más estables al poseer menor energía de enlace.

7.3.3.5 El nuevo complejo CCR5-gp120-CD4 adquirido por este método es sometido a un análisis estructural mediante los programas computacionales que permitieron medir la interacción de los aminoácidos del segmento V3 con CCR5 en los siguientes parámetros:

Rango de Traslape: *Este es un numero variable desde 0 hasta 1 denotando el rango de traslape. El rango de traslape es el número esperado de pares en la población que intercambiarán material genético. Corregir este valor a 0 torna el Algoritmo Genético en un método de programación evolucionaria (EP), pero EP puede requerir probablemente un incremento concomitante en el rango de mutaciones del algoritmo genético con el objeto de ser eficiente.*

- distancia de enlace
- campos energéticos
- formación de puentes de hidrógeno
- interacción de regiones polares
- interacciones de Van der Waals.

7.3.3.6 Finalmente con esta información se obtuvieron conclusiones acerca del mecanismo de reacción sugerido para obtener este complejo CCR5-gp120-CD4.

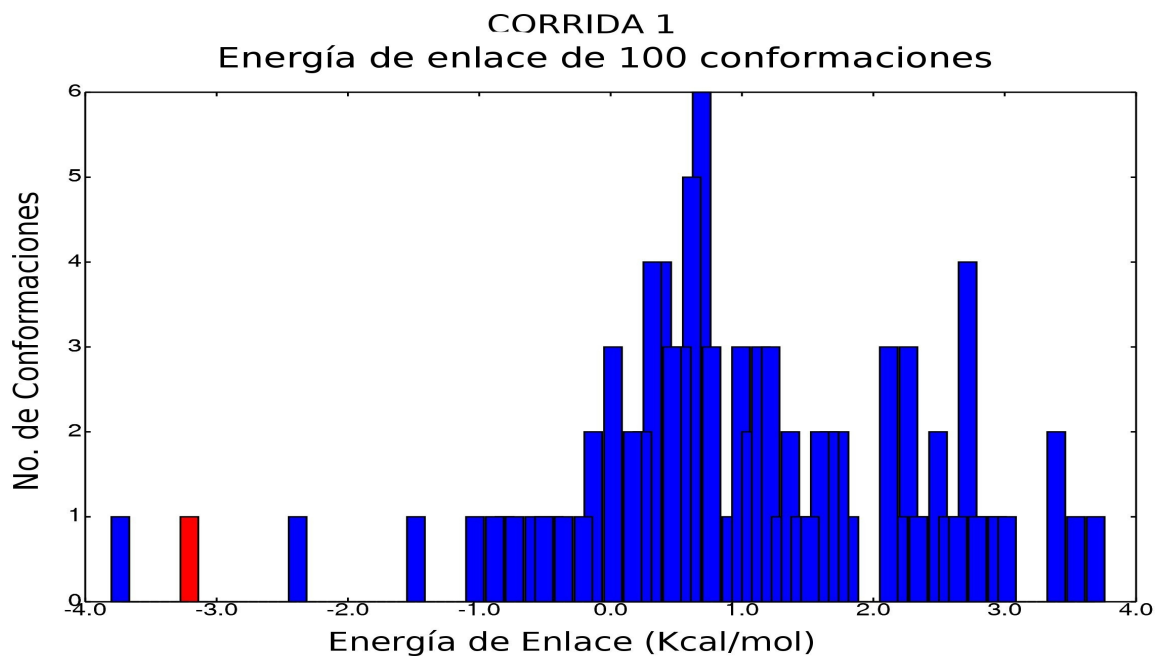
8. Resultados

8.1 Resultados de Cada Corrida

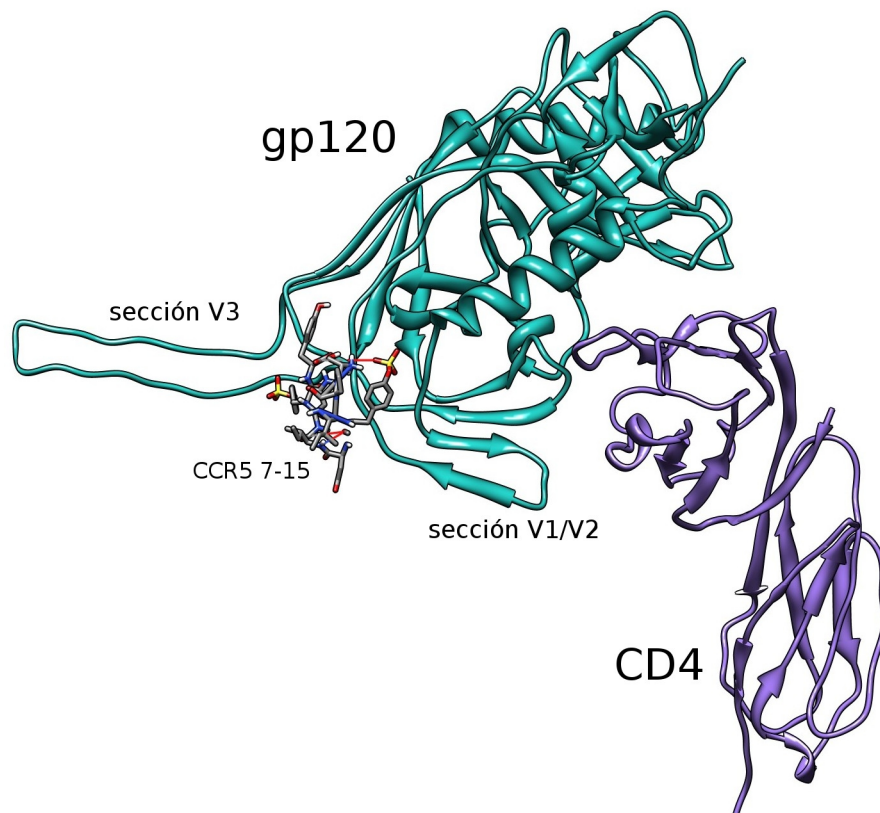
CORRIDA 1

Primero fue evaluado el segmento CCR5₇₋₁₅(ligando) contra el complejo gp120-CD4 en una malla que cubre ambas secciones propuestas en la literatura como más reactivas: V3 y V1/V2; dicha malla no tiene enfoque específico en ninguna de las dos zonas, únicamente se realizó con la intención de evaluar a grandes rasgos el comportamiento del ligando. En las gráficas que se muestran a continuación se aprecia la posición de dos de las mejores respuestas de 100 soluciones posibles que alcanzaron una conformación óptima por sobre los millares de probabilidades de conformaciones que propone el programa, y de estas 100 posibilidades se seleccionó un determinado número respuestas en base a su energía de enlace, energía de conformación interna y a la lógica del contexto de la posición del ligando respecto a su receptor:

Gráfica No.13

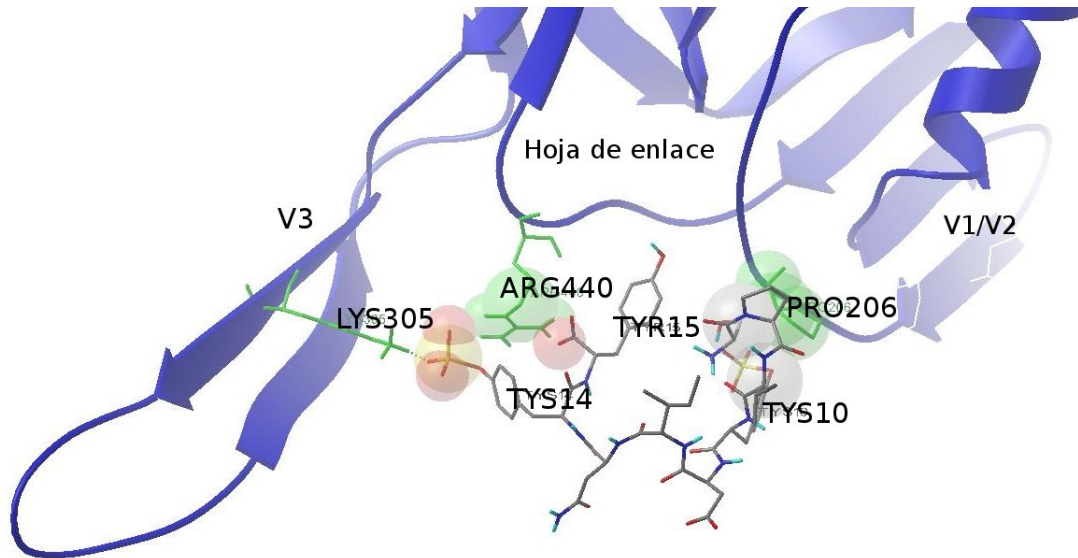


Gráfica No.13:A- Gráfica de barras donde se muestran las 100 conformaciones más estables obtenidas en la CORRIDA 1 con el programa Autodock 4.1. De estas 100 conformaciones la que fue elegida fue la segunda de izquierda a derecha, por ser la que posee la más baja energía (-3.19 cal de enlace ligando-receptor) y que se encuentra en una posición lógica.

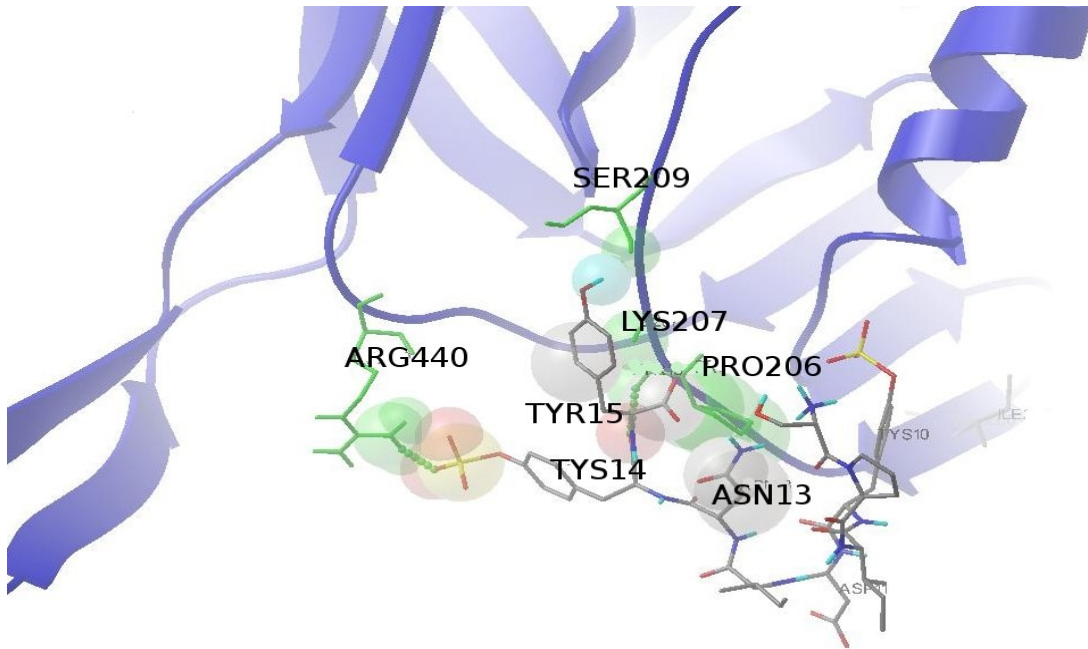


Gráfica No.13:B-Esquema general del complejo gp120-CD4: vista panorámica de la posición del ligando respecto al complejo gp120-CD4 que se observa en diagrama tipo *Ribbon*[†](191), CCR5 se presenta en diagrama de líneas y barras.

[†]*Ribbon*: Del inglés “cinta”, termino utilizado comúnmente en programas de modelaje molecular para describir este estilo característico de representación de biomoléculas que facilita su interpretación.



Gráfica No.13: C- Aproximación de la conformación de la CORRIDA 1, Rango 1/100, se puede apreciar en detalle la conformación de CCR5 respecto a gp120, claramente se encuentra posicionado entre V3, la hoja de enlace y la sección V1/V2. Esta es conformación elegida por el programa como Rango 1/100 lo que se interpreta como la primera posición elegida por el programa en base a la energía de enlace más baja (-3.77 Kcal/mol), y ha sido descartada por encontrarse posicionada en medio de las tres regiones más reactivas de gp120. El análisis que condujo a tomar la conformación de rango 2/100 como conformación óptima para esta corrida se detalla en la sección Discusión de Resultados. Los puentes de hidrógeno son representados como puntos verdes, los aminoácidos que intervienen por parte de gp120 son de color verde, CCR5 está esquematizado como estructuras de líneas, gp120 fue esquematizado como estructura *Ribbon*, todas las interacciones atómicas intermoleculares han sido marcadas en esferas de colores, rojo-oxígeno, amarillo-azufre, azul-nitrógeno, gris-carbono.



Gráfica No.13: D- Detalle del enlace CCR5- 7-15 a gp120, Corrida 1, Rango 2/100. En el rango 2/100 ya no existe una interacción directa con el segmento V3, únicamente con ARG440 que pertenece a la hoja de enlace y la sección V1/V2 en los aminoácidos PRO206-SER209.

Detalles de la Corrida 1

Tabla No.7: Comparación entre rangos de la Corrida 1

Propiedad	Rango 1/100	Rango 2/100
Energía de enlace	-3.77 Kcal/mol	-3.19 Kcal/mol
Energía Intermolecular	-9.25 Kcal/mol	-6.14 Kcal/mol
Energía Interna :	-11.42 Kcal/mol	-13.94 Kcal/mol
Energía Torsional :	10.43 Kcal/mol	10.43 Kcal/mol
Energía Extendida de No Enlace	-6.47Kcal/mol	-6.47 Kcal/mol
Cluster RMS:	0.0	0.0
Ref RMS:	7.2	7.2

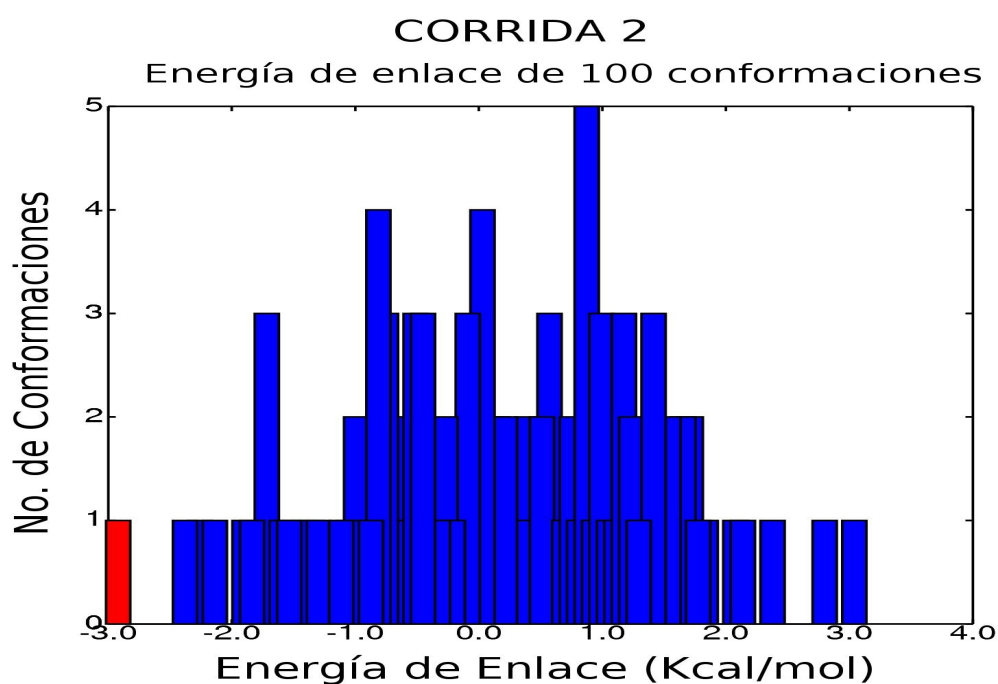
RMS: Root Mean Square (raíz cuadrática media)

Cluster RMS: Indica la posición referente a la agrupación de soluciones que se le solicita al programa, en esta situación no se le asignó ningún valor.

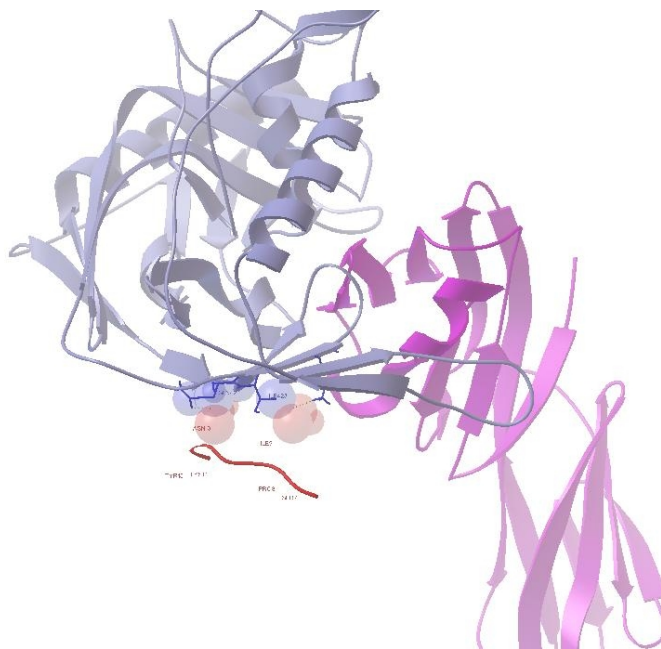
CORRIDA 2:

En esta corrida se evaluó explícitamente la interacción del segmento CCR5 contra la región V1/V2, para lo cual se utilizó el archivo 1OPW como receptor y el archivo CCR5 7-15 como ligando. Se presenta a continuación los datos de los mejores enlaces asignado por el programa.

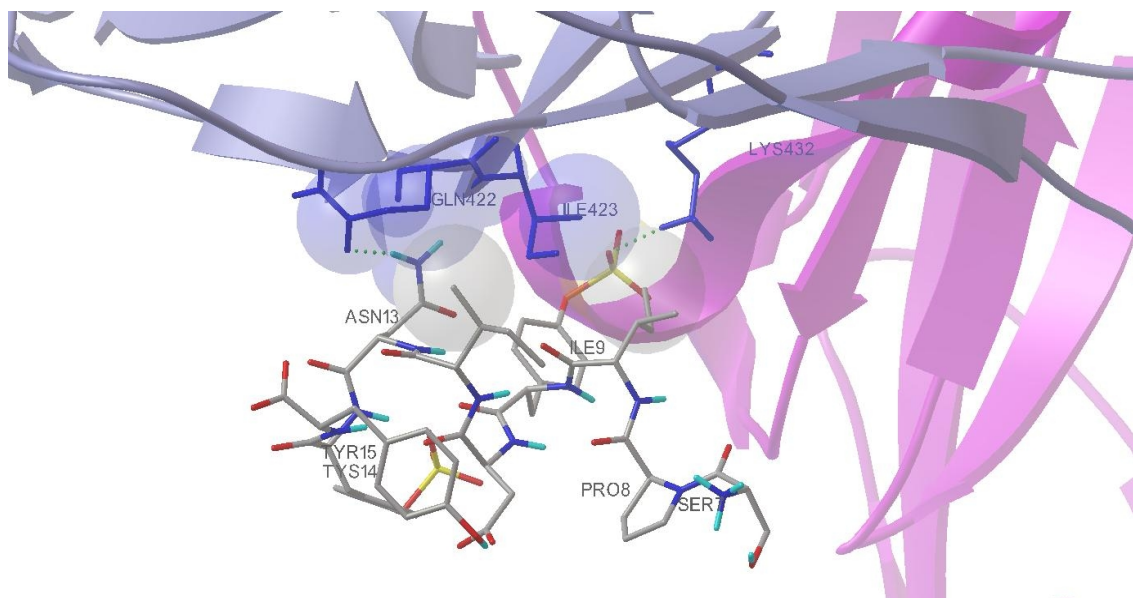
Gráfica No. 14



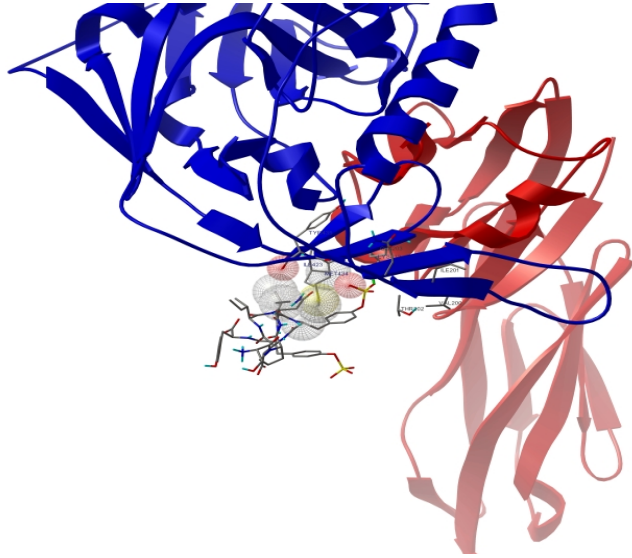
Gráfica No.14. A- Gráfica de barras que ilustra la distribución de las conformaciones en la corrida 2 respecto a su energía. La electa como rango 1/100 por el programa Autodock 4.1 ha sido marcada en rojo.



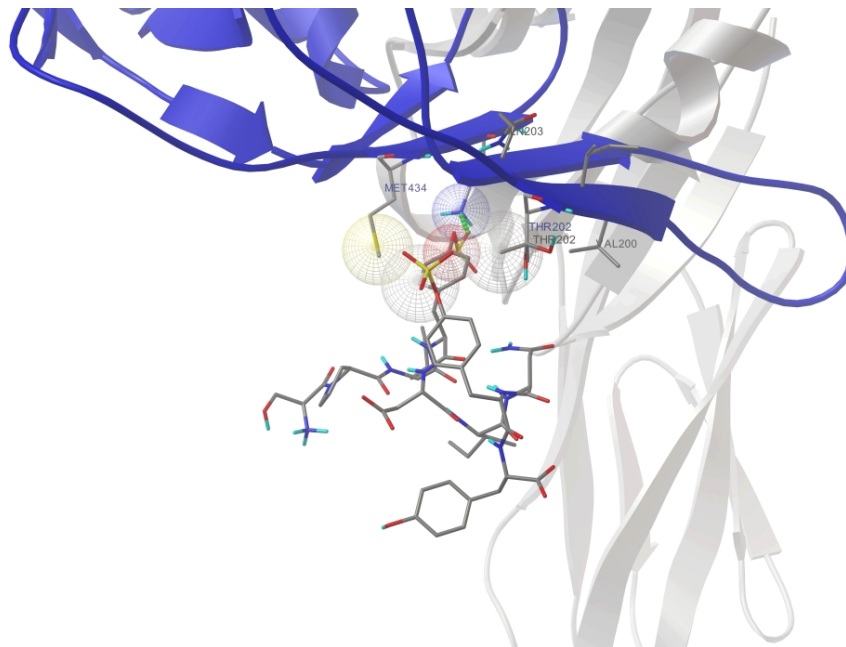
Gráfica No.12. B-Esquema General del complejo CD4-gp120-CCR5 7-15.



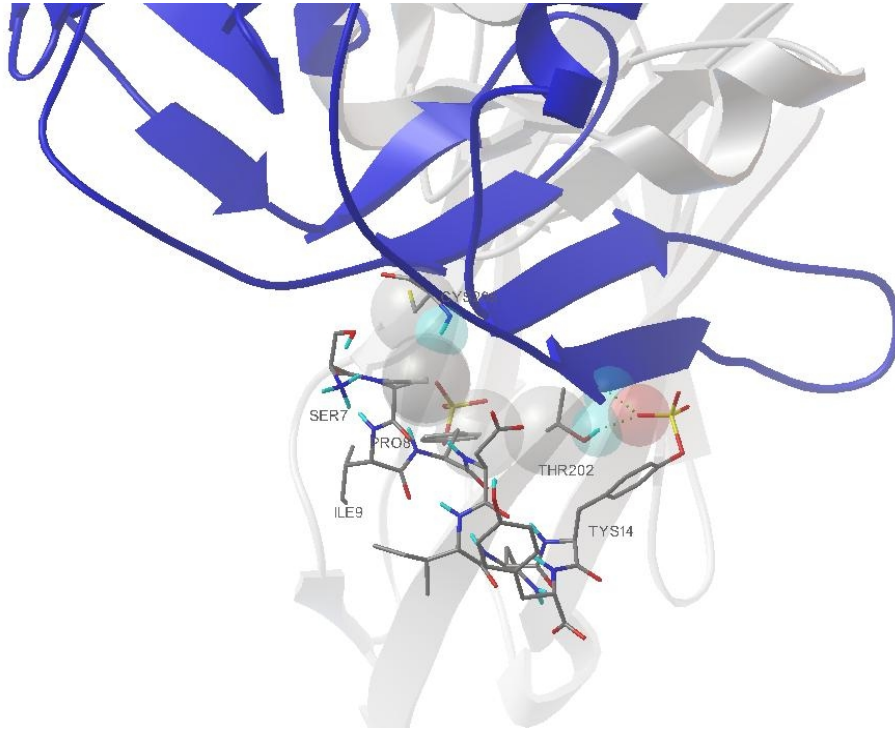
Gráfica No.14. C-Interacción en Corrida 2 Rango 1/100. Es posible apreciar el contacto del GLN422 mediante puente de hidrógeno con ASN13, así como también el puente de hidrógeno existente entre TYR15 y ILE423 de la región de la hoja de enlace en gp120, estas interacciones son ayudadas por ILE9 en CCR5 y por LYS432 en gp120.



Gráfica No.14.D-Interacción en Corrida 2 Rango 14/100. CD4 se observa en color rojo y esquema Ribbons, gp120 de VIH se representa en color azul y en esquema de *Ribbons*, y CCR5 1-15 está representado en estructura de líneas.



Gráfica No.14: E-Acercamiento de la interacción en Corrida 2 Rango 14/100. Se observa la formación de un puente de hidrógeno entre TYS10 de CCR5 y LYS432 en gp120 y la interacción del azufre en MET434 con el sistema de electrones π conjugados presentes en la misma TYS10.



Gráfica No.14: F- Interacción en Corrida 2, Rango 21/100: el despliegue del segmento CCR5 7-15 ha ocurrido en la región V1-V2 principalmente. Al fondo en gris se observa CD4, en *Ribbons* azul gp120.

Detalles de la Corrida 2

Tabla No.8: Comparación entre rangos de la Corrida 2

Propiedad	Rango 1/100	Rango 14/100	Rango 21/100
Energía de enlace	-2.95 Kcal/mol	-1.3 Kcal/mol	-0.83 Kcal/mol
Energía Intermolecular	-8.2 Kcal/mol	-5.7 Kcal/mol	-6.89 Kcal/mol
Energía Interna :	-6.09 Kcal/mol	-6.94 Kcal/mol	-5.27 Kcal/mol
Energía Torsional :	11.34 Kcal/mol	11.34 Kcal/mol	11.34 Kcal/mol
Energía Extendida de No Enlace	0.0 Kcal/mol	0.0 Kcal/mol	0.0 Kcal/mol
Cluster RMS:	0.0	0.0	0.0
Ref RMS:	11.84	8.99	6.1

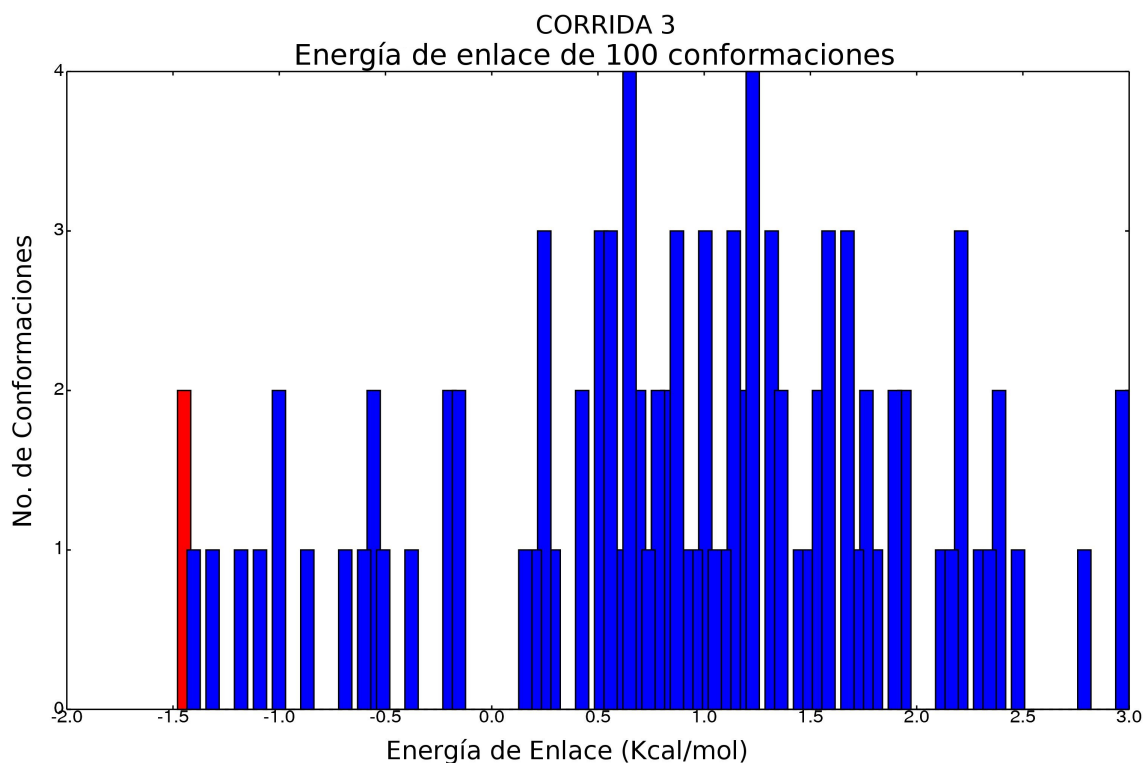
RMS: Root Mean Square (raíz cuadrática media)

Cluster RMS: Indica la posición referente a la agrupación de soluciones que se le solicita al programa, en esta situación no se le asignó ningún valor.

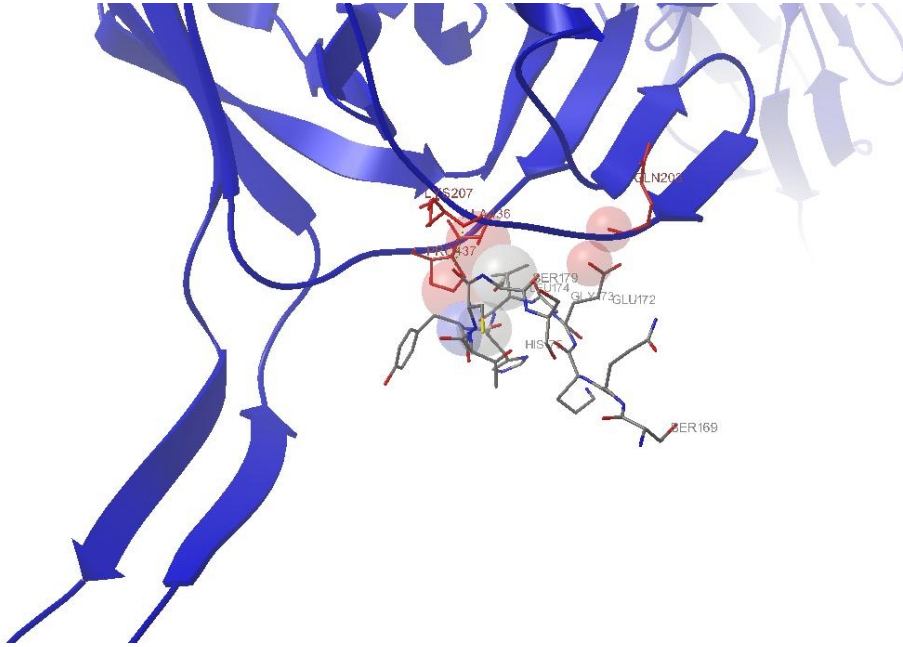
CORRIDA 3

Para determinar la forma de interacción del segmento extracelular 2 con gp120, se comenzó caracterizando las energías de enlace del complejo CD4-gp120 y una pequeña sección de CCR5, únicamente el segmento ECL2. En esta corrida se evaluó el comportamiento general de ECL2 contra gp120, sin observar ninguna región en particular.

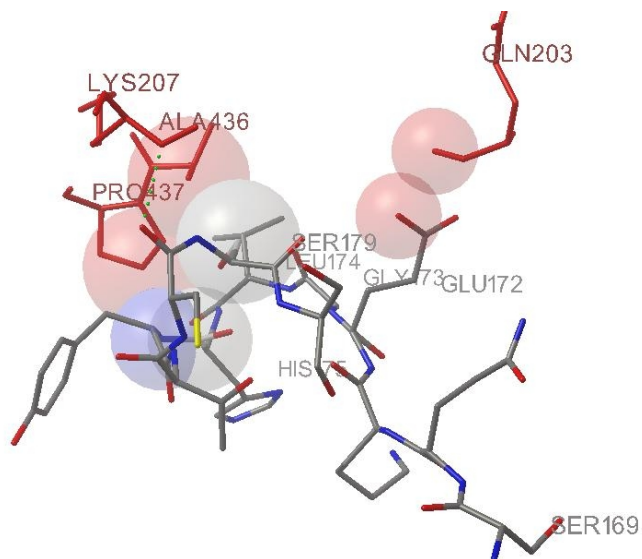
Gráfica No.15



Gráfica No. 15: A- Gráfica de la relación entre en número de conformaciones y la Energía de enlace en la Corrida 3.



Gráfica No. 15: B-Contexto de la interacción de ECL2 contra gp120; Corrida 3 Rango1/100 Corrida 3, Rango 1/100: Se aprecia cómo gp120 interacciona en sus hojas de enlace y V1/V2 con el segmento extracelular 2. Esta es la conformación que Autodock registra como óptima.



Gráfica No. 15: C-Detalle de Corrida 3 Rango 1/100: se observa que las interacciones más claras son de PRO437-SER179 (los aminoácidos en rojo pertenecen a gp120, el resto a CCR5); ALA436-LEU174, GLY173-GLN203.

Detalles de la Corrida 3

Tabla No.9: Comparación entre rangos de la Corrida 3

Propiedad	Rango 1/100
Energía de Enlace	-1.47 Kcal/mol
Energía Intermolecular	-6.74 Kcal/mol
Energía Interna	-7.86 Kcal/mol
Energía Torsional	13.13 Kcal/mol
Energía Extendida de No Enlace	0.0 Kcal/mol
Cluster RMS	0.0
Ref RMS	7.24

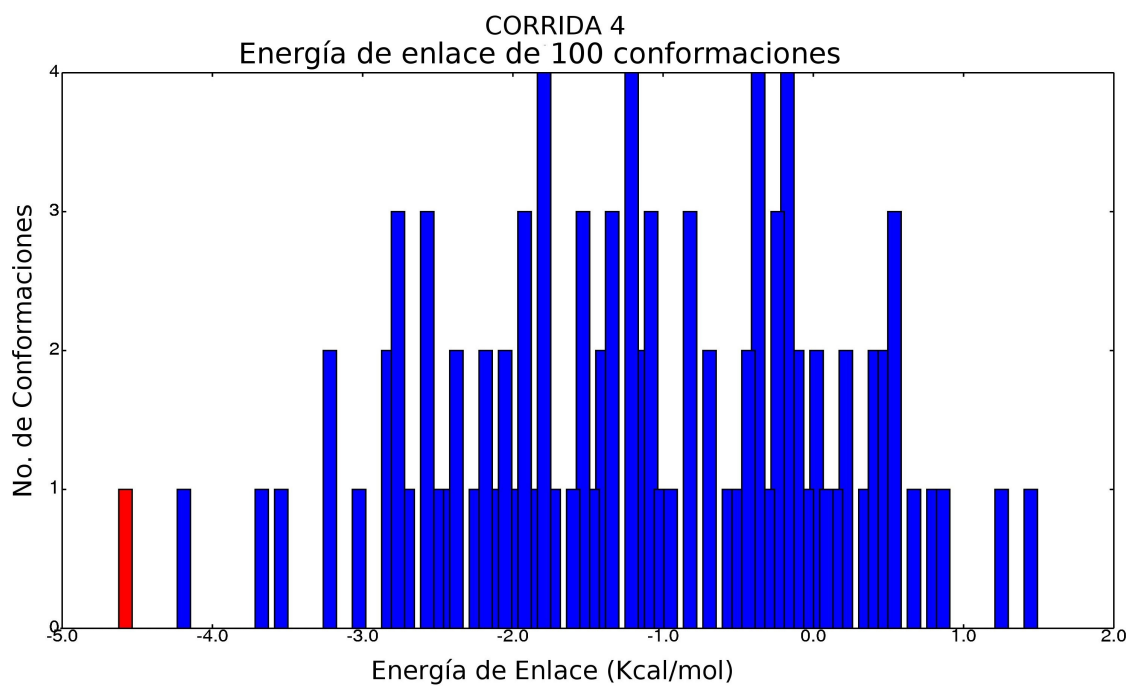
RMS: Root Mean Square (raíz cuadrática media)

Cluster RMS: Indica la posición referente a la agrupación de soluciones que se le solicita al programa, en esta situación no se le asignó ningún valor.

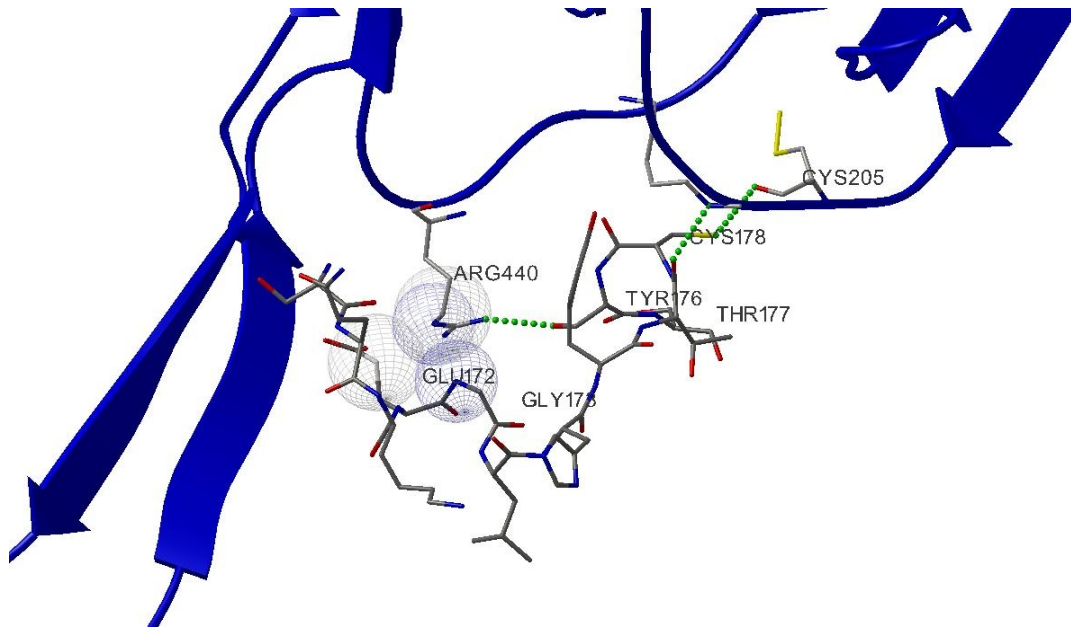
CORRIDA 4

En esta corrida también se ha enlazado ECL2 a gp120-CD4 en la misma región, la diferencia es que esta vez se le han asignado al ligando (ECL2) en su cadena peptídica 20 torsiones aleatorias, cada una con grados de libertad de rotación aleatoria, además se han agregado 12 torsiones aleatorias en el segmento de V3 en gp120 a los aminoácidos SER169-SER180. Esto permite a los aminoácidos con torsiones girar en sus enlaces sobre sí mismos, haciendo cambiar significativamente la conformación de ECL2. Como se verá en las gráficas siguientes, las conformaciones desarrolladas por Autodock han resultado totalmente independientes de las conformaciones reales posibles para ECL2 lo que era de esperarse, pero lo importante de esta corrida es analizar el comportamiento de cada aminoácido en ECL2 para comprender su interacción total con todas las regiones reactivas de gp120 (V3, la hoja de enlace y V1/V2 esencialmente). Por esto se añade a continuación varias de las soluciones propuestas por el programa como las menos energéticas.

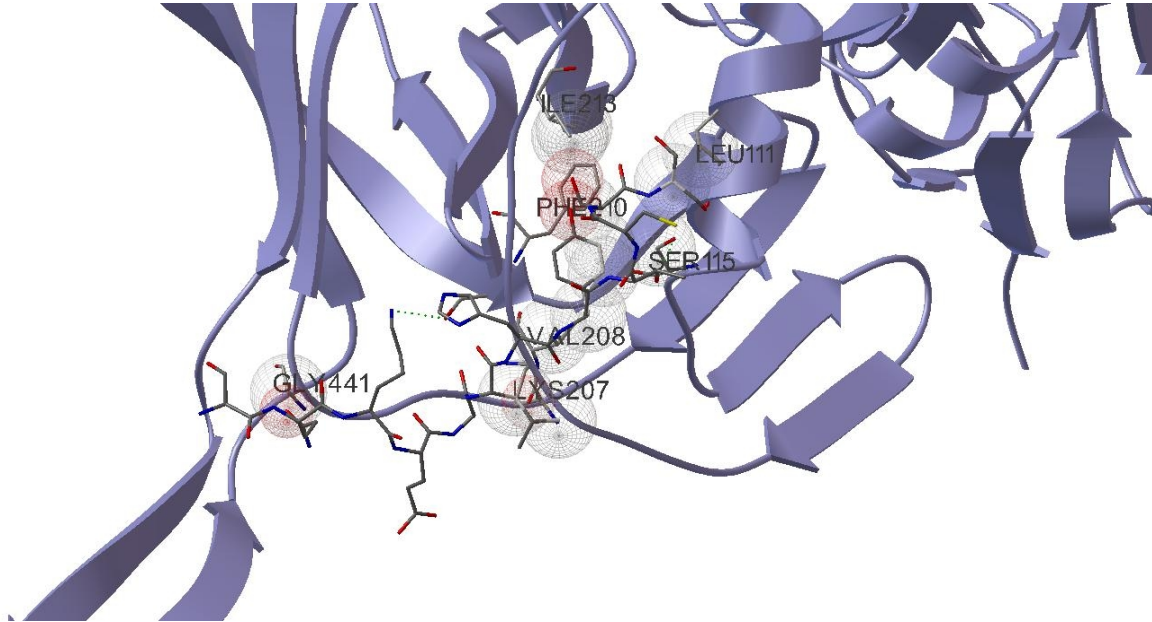
Gráfica No.16.



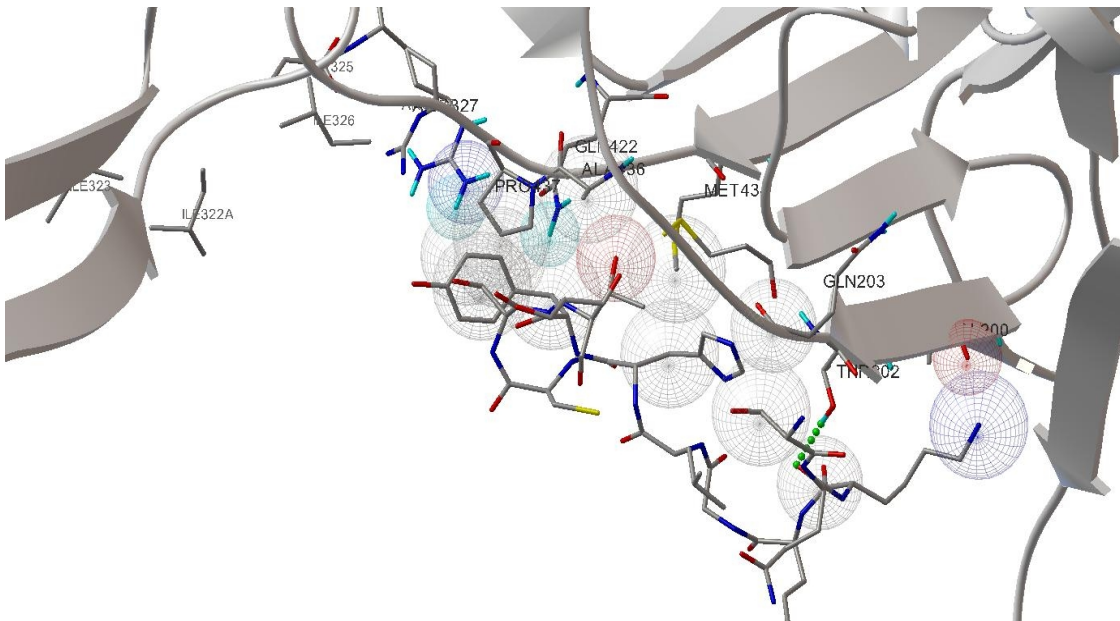
Gráfica No.16: A- CORRIDA 4, Energía de enlace de 100 conformaciones: se puede apreciar que la energía más baja se encuentra a -4.5 Kcal/mol en la escala energética que compara el total de las 100 conformaciones de la Corrida 4.



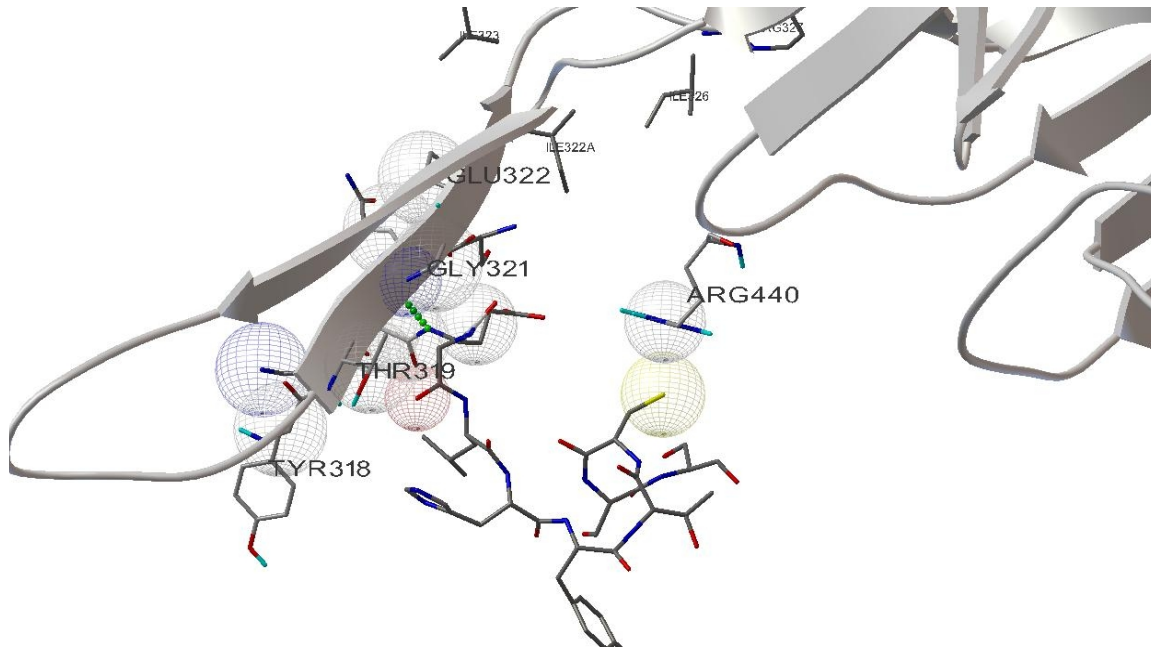
Gráfica No.16: B- Interacción en Corrida 4, Rango 1/100: gp120 se presenta en color azul y en esquema *Ribbons*, ECL2 se aprecia en estructura de líneas. Las interacciones principales de este conformero se observan en ARG440 que enlaza puentes de hidrógeno a TYR176, y a su vez con GLU172 en interacción electrostática de los grupos amino y carbonilo. Se forman dos puentes de hidrógeno entre las CYS178, TYR176 y CYS205. Esta conformación es la más estable en su relación de energía de enlace y es la propuesta por Autodock como la mejor solución. Se puede apreciar también una ruptura típica de la conformación de ECL2.



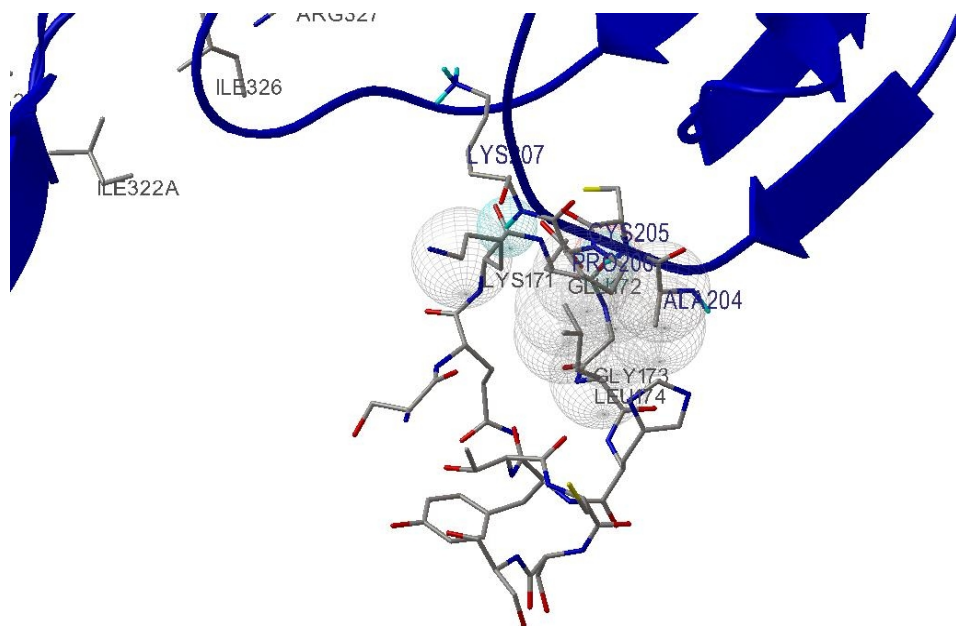
Gráfica No.16: C-Interacción en Corrida 4, Rango 2/100: En esta gráfica se puede observar que el segmento ECL2 representado en conformación de líneas se ha distribuido hacia el núcleo de gp120 comenzado por la interacción cercana en la hoja puente GLY441 y que es estabilizado por el segmento V3 y se extiende hacia LEU11 que se encuentra en el extremo opuesto de la hoja de enlace, esto se da en una conformación de ECL2 imposible en términos mecánicos, y es la segunda propuesta menos energética respecto de su energía de enlace propuesta por Autodock.



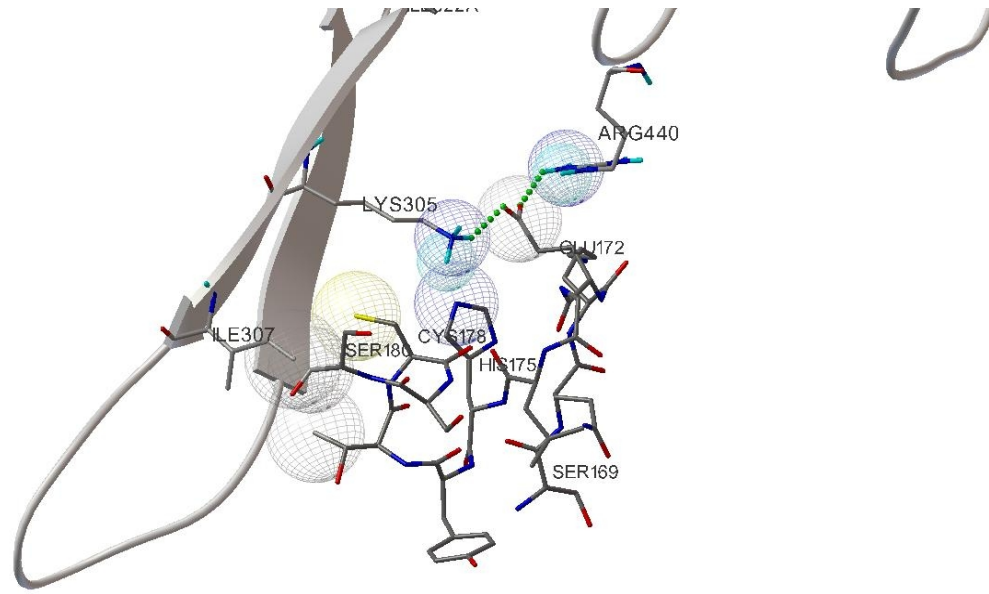
Gráfica No.16: D- Interacción en Corrida 4, Rango 3/100: En esta conformación ECL2 también se encuentra distribuida a lo largo de gp120 y confirma la alta reactividad de las regiones de la hoja de enlace y la región V1/V2 lo que puede sugerir que esta región es de suma importancia para la orientación de ambas proteínas durante el mecanismo de enlace gp120-CCR5.



Gráfica No.16: E- Interacción en Corrida 4, Rango 4/100: Esta es una de las interacciones energéticas más baja que también muestra una concordancia con las propiedades físicas y mecánicas de ECL2 en cuanto a la conformación que se espera guarde este segmento. Se puede observar que CCR5 7-15 interactúa con la región media de V3 y con ARG440 de gp120 que es uno de los aminoácidos que ha destacado en la interacción con CCR5. Si embargo ECL2 se encuentra al revés respecto a su orientación con CCR5 en la interacción global gp120-CCR5. Gp120 ha sido representado en color gris y en estructuras *Ribbons*.



Gráfica No.16: F- Interacción en Corrida 4, Rango 8/100: Se ha seleccionado esta conformación por ser una de las 10 conformaciones mejor favorecidas energéticamente en el enlace a gp120 y además guarda una relación conformacional correcta respecto a ECL2 en estado nativo, sin embargo su relación respecto al complejo gp120-CCR5 se considera inapropiada en relación con los demás resultados obtenidos.



Gráfica No. 16: G- Interacción en Corrida 4, Rango 9/100: Esta conformación fue seleccionada por ser también una de las 10 conformaciones energéticas mejor favorecidas, en el esquema no es posible apreciar correctamente la conformación que guarda ECL2, pero es aceptable respecto a su forma no enlazada en CCR5, además esta es la única conformación energéticamente favorable que también guarda una lógica en la posición de contexto respecto al complejo CCR5-gp120. Es notable la importancia que guarda GLU172 por la formación de un doble puente de hidrógeno (representado por puntos verdes) que lo conectan con LYS305 Y ARG440. Sigue siendo importante la interacción de CYS 176 con SER180 en el segmento V3

Detalles de la Corrida 4

Tabla No.10: Comparación entre otros parámetros de cada Rango en la Corrida 4

Propiedad	R1/100	R2/100	R3/100	R4/100	R8/100	R9/100
Energía Enlace	-4.58	-4.22	-3.68	-3.57	-2.86	-2.83
Energía Intermolecular	-6.14	-7.96	-6.9	-5.48	-3.85	-3.65
Energía Interna	-11.57	-9.39	-9.91	-11.22	-12.14	-12.3
Energía Torsional	13.13	13.13	13.13	13.13	13.13	13.13
Energía Extendida de No Enlace	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cluster RMS	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ref RMS	6.62	15.54	12.1	9.67	5.82	9.6

Todos las energías están dados en Kcal/mol.

Rx/100 = Rango X de 100.

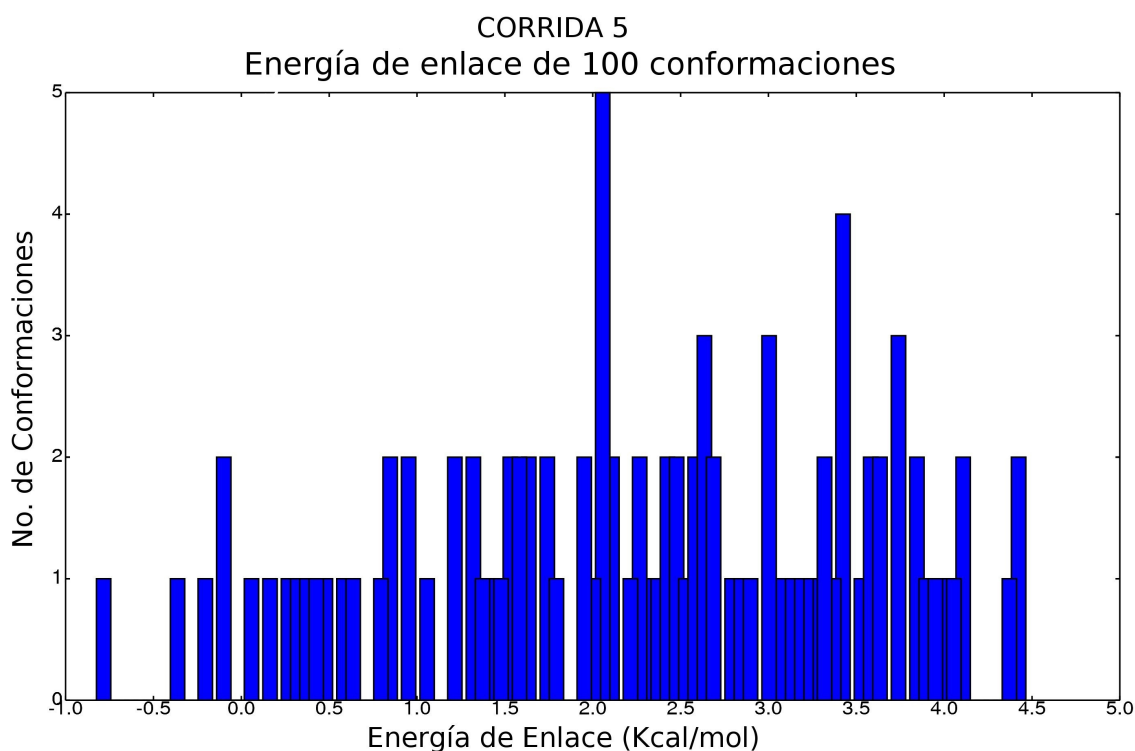
RMS: Root Mean Square (raíz cuadrática media)

Cluster RMS: Indica la posición referente a la agrupación de soluciones que se le solicita al programa, en esta situación no se le asignó ningún valor.

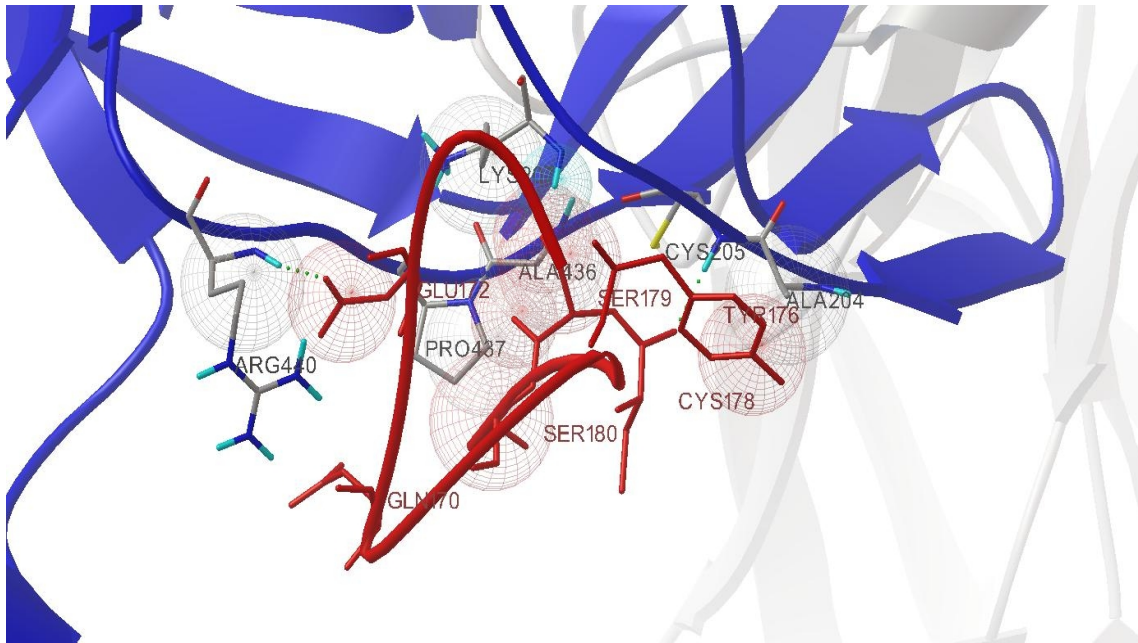
CORRIDA 5

En esta corrida se evaluó específicamente la interacción de ECL2 del correceptor CCR5 con el segmento V1/V2 presente en gp120, para lo cual se diseñó una malla electrónica que cubriera ampliamente la región V1/V2, y ECL2 solamente se le han permitido 6 torsiones en cadenas R lateral, de manera que su cadena peptídica permaneció rígida. El objetivo de esta corrida es evaluar con precisión si existe alguna interacción específica en ECL2 con V1/V2 en el enlace del complejo CCR5-gp120-CD4, o si es posible descartar absolutamente tal interacción.

Gráfica No.17

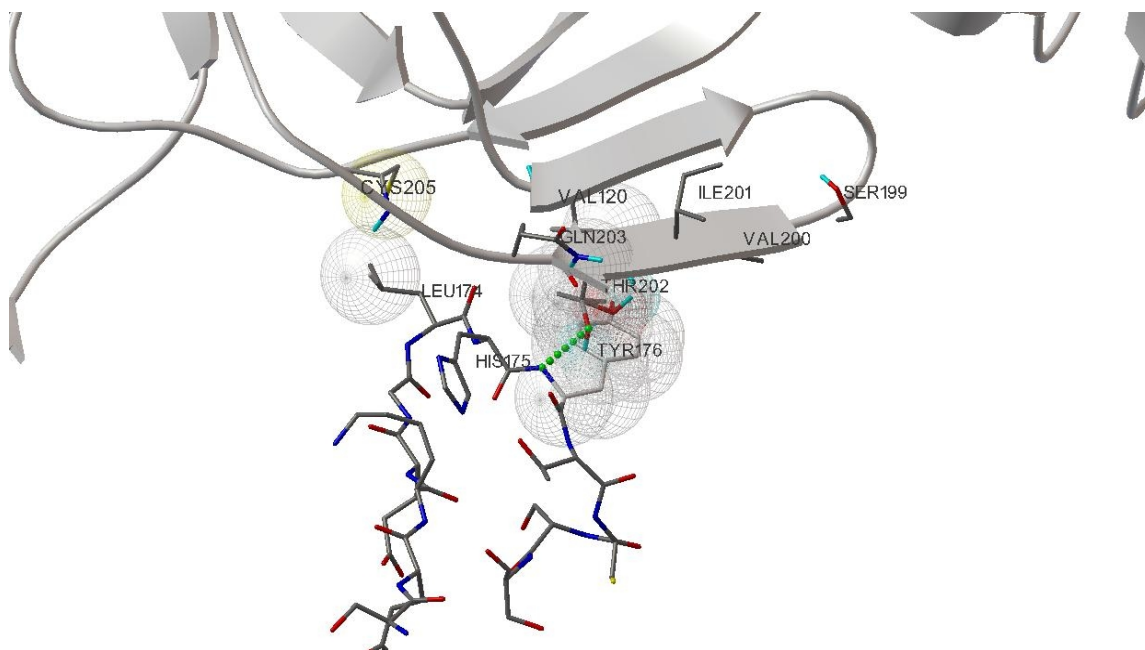


Gráfica No.17: A- CORRIDA 5, Energía de enlace de 100 conformaciones.



Gráfica No.17: B- Interacción en Corrida 5, Rango 1/100: Es posible apreciar que la conformación menos energética referente al enlace de ECL2 de CCR5 con gp120 de VIH, se orienta firmemente a la región de la hoja de enlace con algunas interacciones en la región V1/V2. gp120 ha sido representado en color azul y en esquema *Ribbons*, los aminoácidos de gp120 que interaccionan directamente con ECL2 han sido resaltados en estructura de líneas, ECL2 ha sido representado en color rojo y en estructura de *Ribbons*, y sus aminoácidos que interaccionan con gp120 se representan en estructura de líneas color rojo. Al fondo es posible apreciar a CD4 como estructura *Ribbons* de color blanco.

Las interacciones más importantes que se aprecian en el esquema son: la de ARG44-GLU172; PRO487-SER180; ALA436-SER179; CYS178-ALA204.



Gráfica No.17: C- Interacción en Corrida 5, Rango 2/100: En la imagen superior se observa la única interacción importante encontrada para la relación ECL2-V1/V2, en la imagen se puede observar que el contacto directo es pobre entre ambas secciones y la energía de enlace reportada para esta interacción (0.4 Kcal/mol) es positiva, por tanto endotérmica. gp120 ha sido descrita como estructura *Ribbons* gris y ECL2 como estructura de líneas.

Detalle de la Corrida 5:

Tabla No.11: Comparación entre rangos de la Corrida 5

Propiedad	Rango 1/100	Rango 2/100
Energía de enlace	-0.81 Kcal/mol	0.4 Kcal/mol
Energía Intermolecular	-7.76 Kcal/mol	-6.81 Kcal/mol
Energía Interna :	-6.17 Kcal/mol	-6.27 Kcal/mol
Energía Torsional :	13.13 Kcal/mol	13.13 Kcal/mol
Energía Extendida de No Enlace	0.0	0.0
Cluster RMS:	0.0	0.0
Ref RMS:	7.2	7.2

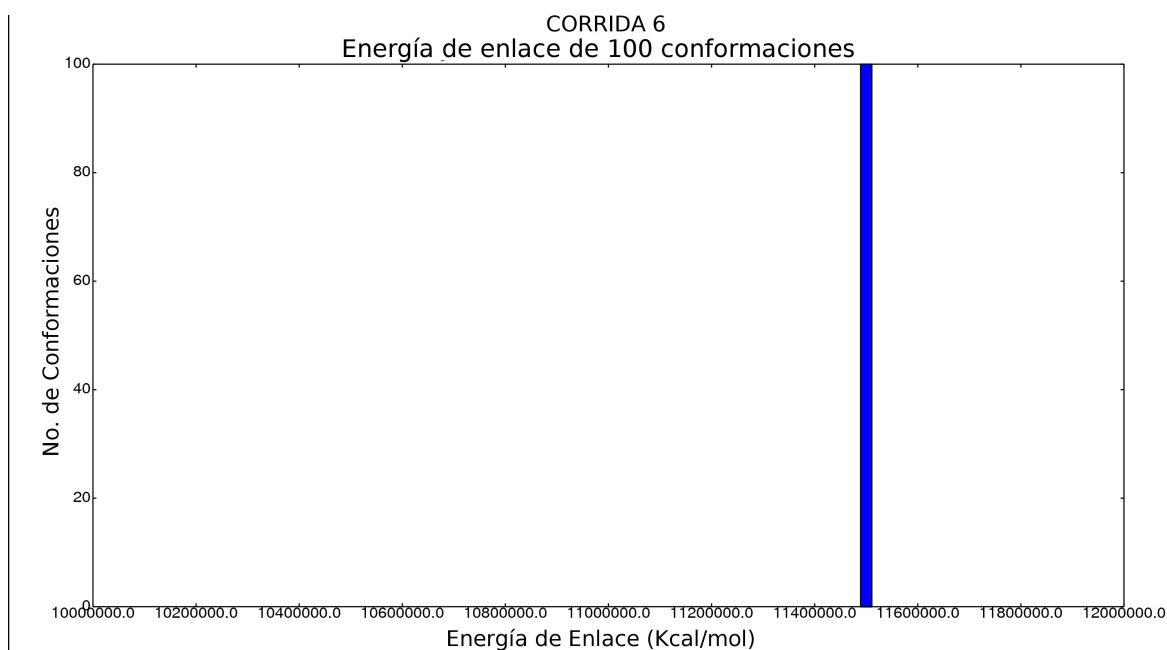
RMS: Root Mean Square (raíz cuadrática media)

Cluster RMS: Indica la posición referente a la agrupación de soluciones que se le solicita al programa, en esta situación no se le asignó ningún valor.

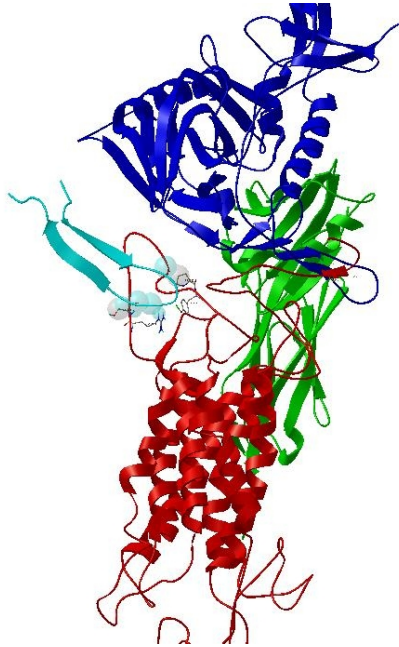
CORRIDA 6

Esta corrida fue diseñada para observar la interacción del segmento V3 con el segmento ECL2 del correceptor CCR5 completo. Para ello se utilizaron los archivos V3.pdb y CCR5.pdb. La malla electrónica fue construida alrededor de este segmento, la cual restringe las interacciones de V3.pdb contra CCR5.pdb.

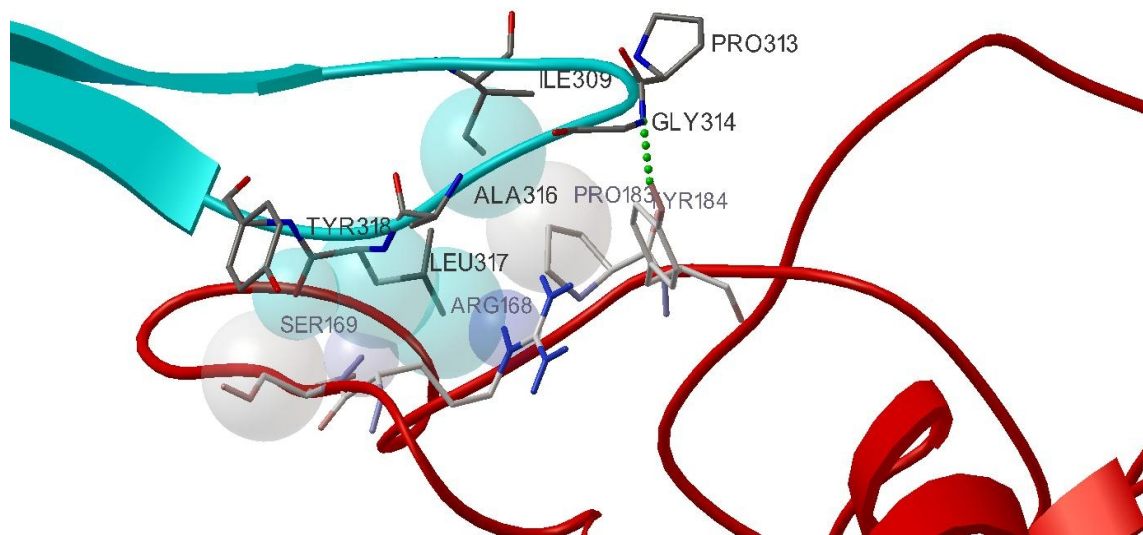
Gráfica No.18



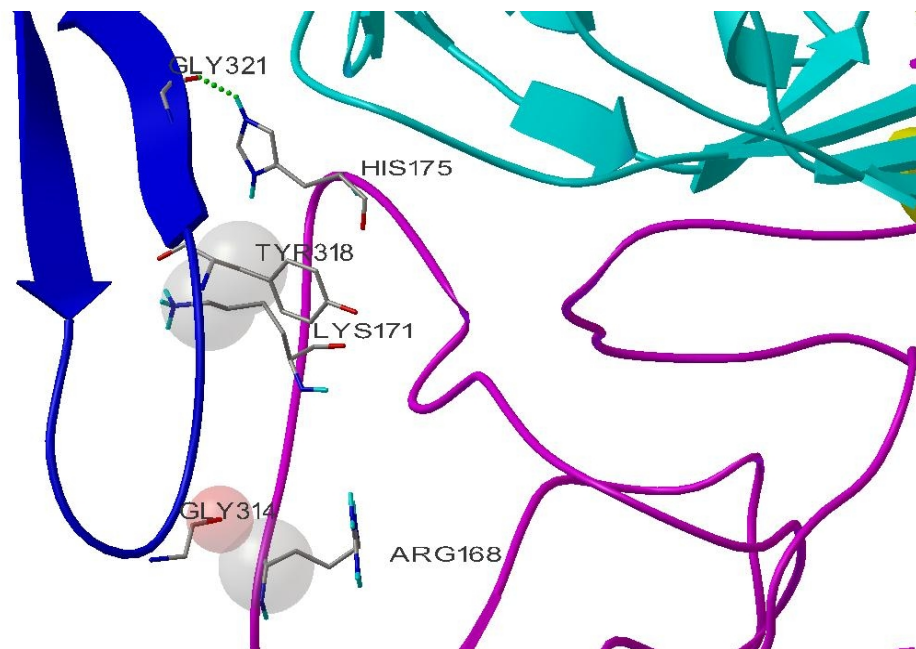
Gráfica No.18: A- CORRIDA 6 Energía de enlace de 100 conformaciones: Todas las conformaciones han reportado la misma energía de enlace. Esto es porque Autodock tiene un tamaño máximo de malla para ubicar al ligando, el tamaño del ligando está muy ajustado respecto de la malla, y esto provoca que la energía de enlace se eleve. Sin embargo las interacciones no solamente se basan en la energía de enlace, y las mediciones de los otros tipos de energía sí son útiles y permiten hacer las comparaciones necesarias.



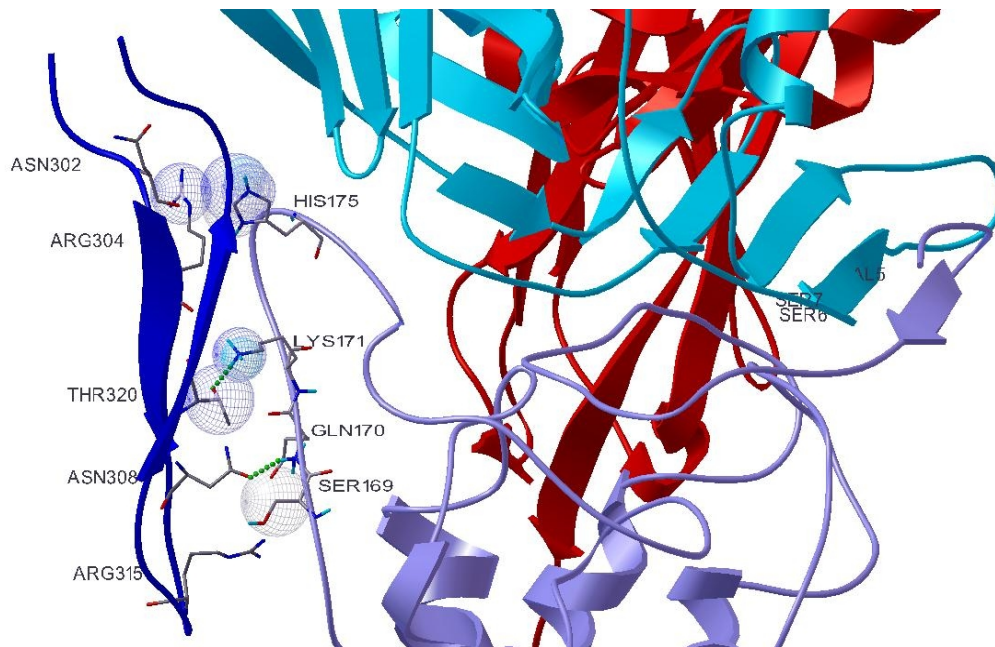
Gráfica No.18: C- Contexto de V3 en su interacción en la Corrida 6 con CCR5-gp120-CD4: Se observa de color celeste el segmento V3 interactuado con el segmento ECL2 en CCR5, esto se da en el marco de la malla electrónica creada para la Corrida 6, la cual pretende evaluar las posibles conformaciones que puede adoptar V3.



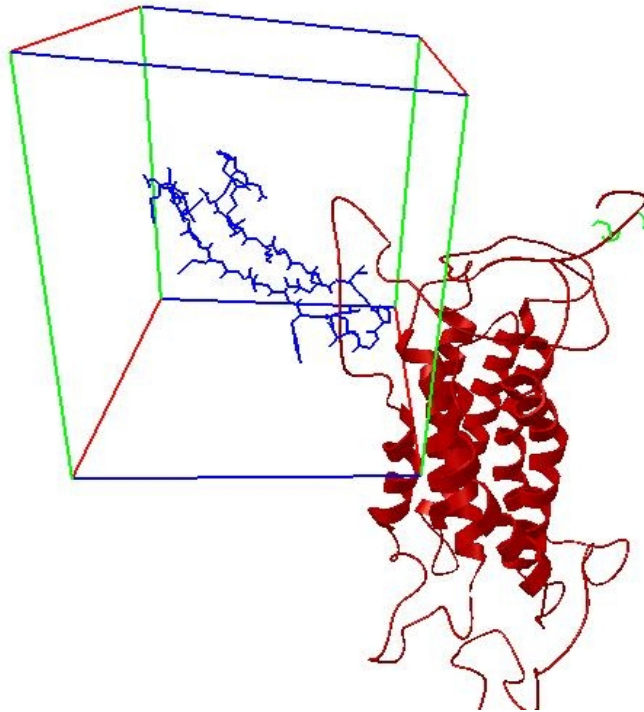
Gráfica No.18: D- Interacción en Corrida 6, Rango 1/100: Puede observarse la interacción electa por el programa Autodock como la óptima tomando como referencia la energía intermolecular reportada para este enlace que es -4.06 Kcal/mol. El segmento V3 de gp120 se observa de color celeste y en esquema *Ribbons*, al igual que CCR5 que se presenta de color rojo. Los aminoácidos de ambas proteínas que entran en contacto han sido representadas en estructura de líneas. Es posible distinguir un puente de hidrógeno representado por puntos verdes entre GLY314 y TYR184, es importante hacer notar que la posición física en este modelo, no encaja con la descripción propuesta por Liu *et. al.* (2003) en el archivo 1OPW.pdb.



Gráfica No.18: E- Interacción en Corrida 6, Rango 13/100: Esta es la primera interacción encontrada que posee un orden coherente con el esquema general propuesto. Se observa que está estabilizada por un puente de hidrógeno formado entre GLY321-HIS175, e interacciones entre TYR318-LYS171 e GLY314-ARG168. El segmento V3 se encuentra representado en color Azul, gp120 en celeste y CCR5 en fucsia. Los aminoácidos que interactúan están representados en esquemas de líneas y tanto V3 como CCR5 en esquema *Ribbons*.



Gráfica No.18: F- Interacción en Corrida 6, Rango 14/100: Otra interacción no muy diferente en el estado energético intermolecular, pero presenta una mejor posición en contexto de V3 en relación con CCR5 y gp120. Aquí las interacciones importantes están descritas por ASN302,ARG304-HIS175, THR320-LYS171, ASN308-GLN170 y por ARG315-SER189. El segmento V3 de gp120 se presenta de color Azul, CCR5 de color morado, gp120 de color celeste y al fondo puede apreciarse CD4 en color rojo. Todas las proteínas se encuentran en esquemas *Ribbons* y los aminoácidos que interactúan en esquemas de líneas.



Gráfica No. 18: G- Malla diseñada en Corrida 6: la malla electrónica diseñada en esta corrida se presenta como un cubo en líneas de colores que encierra al archivo V3.pdb en contexto con el archivo CCR5.pdb, lo cual es una representación real de la forma en la que fue hecha esta corrida.

Detalles de la Corrida 6

Tabla No.12: Comparación entre rangos de la Corrida 6

Propiedad	Rango1/100	Rango13/100	Rango14/100
Energía de enlace	11500000.0	11500000.0	11500000.0
Energía Intermolecular	-4.06	-3.04	-2.12
Energía Interna :	11500000.0	11500000.0	11500000.0
Energía Torsional :	30.13	30.13	30.13
Energía Extendida de No Enlace	0.0	0.0	0.0
Cluster RMS:	0.0	0.0	0.0
Ref RMS:	28.64	28.64	25.88

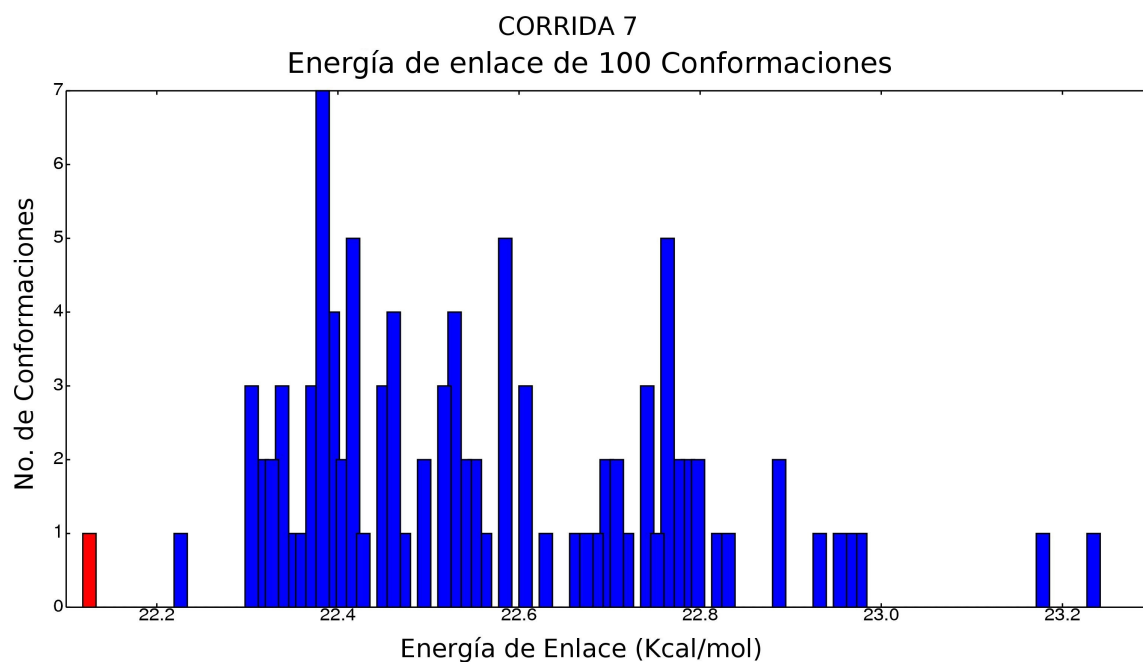
Todas las energías se han representado como Kcal/mol.

RMS: *Root Mean Square* (Raíz Cuadrada Media)

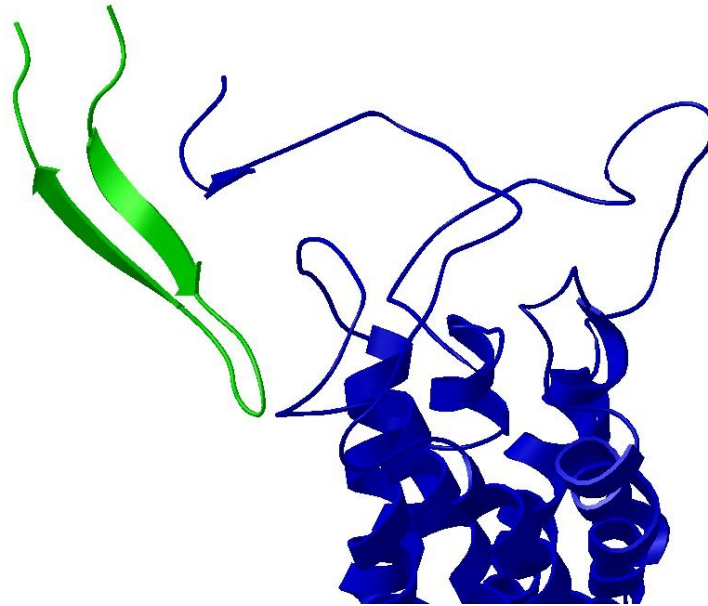
CORRIDA 7

En esta corrida el objetivo fue observar la interacción de V3 contra CCR5 pero esta vez en relación al segmento N Terminal de CCR5, por lo cual se colocó la malla electrónica en la mitad respectiva del correaceptor CCR5. El segmento V3 ha permanecido rígido tanto en su cadena peptídica como en sus cadenas R laterales, y a CCR5 se le han permitido dos rotaciones aleatorias en dos de sus enlaces de cadena R: GLN4 y VAL5, por estar ubicados estos aminoácidos en la región extracelular más flexible de todo el correaceptor.

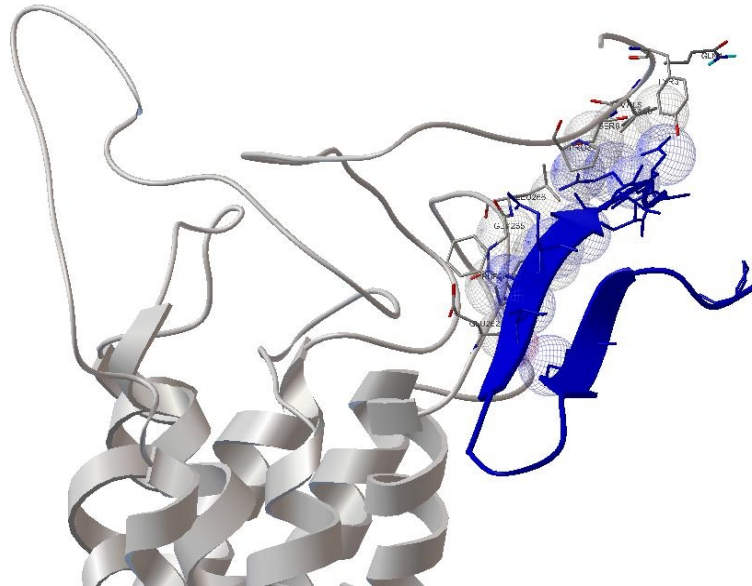
Gráfica No.19



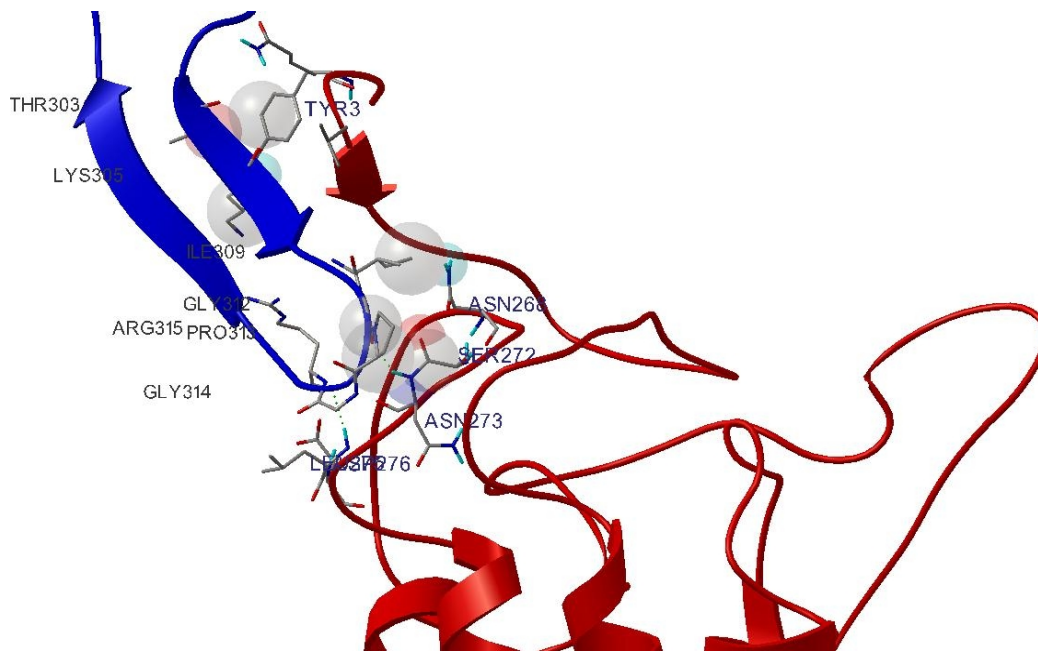
Gráfica No. 19: A- CORRIDA 7, Energía de enlace de 100 conformaciones. Se puede observar que para esta corrida todos los valores energéticos de enlace que se obtuvieron fueron positivos siendo el valor óptimo de esta corrida el más bajo a 22.1 Kcal/mol.



Gráfica No.19: B- Interacción en Corrida 7, Rango 1/100: La gráfica muestra cómo la primera solución según el programa Autodock, que es a su vez la solución menos energética, en cuanto a su posición física no es coherente pues la cresta de la región V3 de gp120 (que se muestra en color azul) interviene con la región de transmembrana de CCR5.



Gráfica No.19: C- Gráfica panorámica de la interacción en Corrida 7, Rango 3/100: Esta solución es una de las menos energéticas y que se encuentra mejor compaginada en el contexto real de la posición de CCR5 respecto a gp120. Puede apreciarse que V3 no solamente hace contacto con la región N-terminal en CCR5, sino que también con el segmento extracelular 1 en CCR5 (ECL1). En esta toma, CCR5 se encuentra girado 180° sobre su eje X en relación a la Gráfica No.17 A. V3 se muestra en color verde y CCR5 en azul, todas son representaciones esquemáticas *Ribbons*.



Gráfica No. 19: D- Detalle en la Interacción de la Corrida 7, Rango 3/100: un acercamiento de esta interacción revela los aminoácidos importantes en la estabilización de este complejo, entre los aminoácidos que interactúan se puede distinguir: ILE309,LYS305-TYR3; GLY314-LYS276, PRO313-ASN273, GLN312-SER272,ASN266.

Detalles de la Corrida 7

Tabla No.13: Comparación entre rangos de la Corrida 7

Propiedad	Rango1/100	Rango13/100
Energía de enlace	22.12 Kcal/mol	22.43 Kcal/mol
Energía Intermolecular	-7.16 Kcal/mol	-7.3 Kcal/mol
Energía Interna :	-0.4 Kcal/mol	-0.39 Kcal/mol
Energía Torsional :	30.13 Kcal/mol	30.13 Kcal/mol
Energía Extendida de No Enlace	0.0 Kcal/mol	0.0 Kcal/mol
Cluster RMS:	0.0	0.88
Ref RMS:	16.46	16.38

RMS: Root Mean Square (raíz cuadrática media)

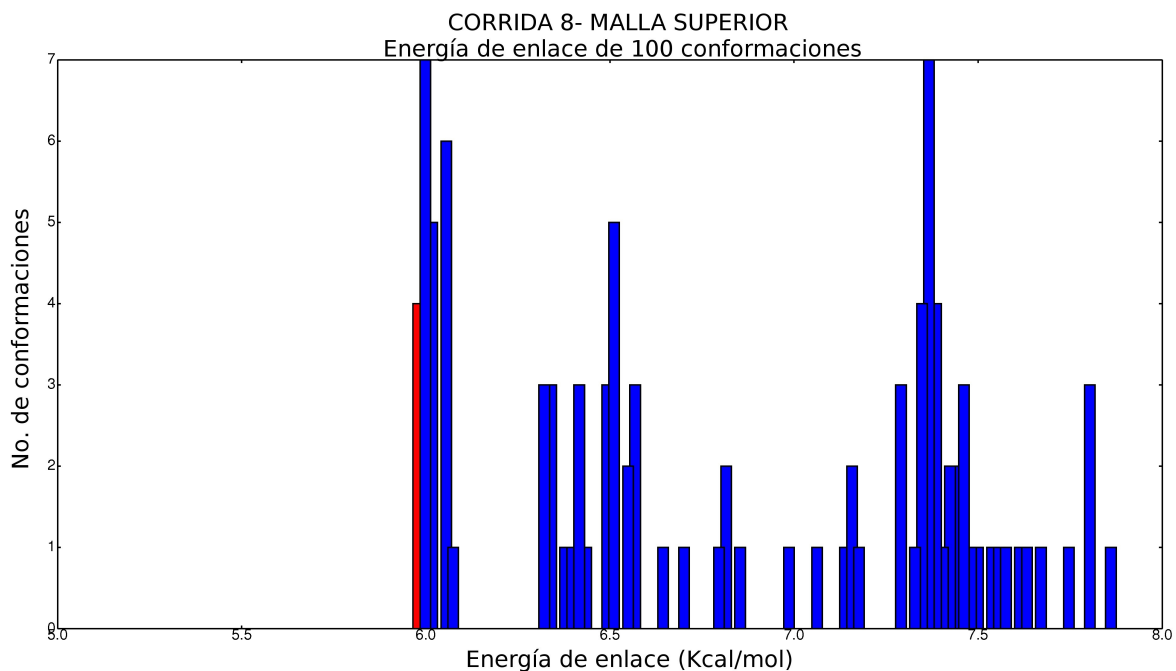
Cluster RMS: Indica la posición referente a la agrupación de soluciones que se le solicita al programa, en esta situación no se le asignó ningún valor.

CORRIDA 8

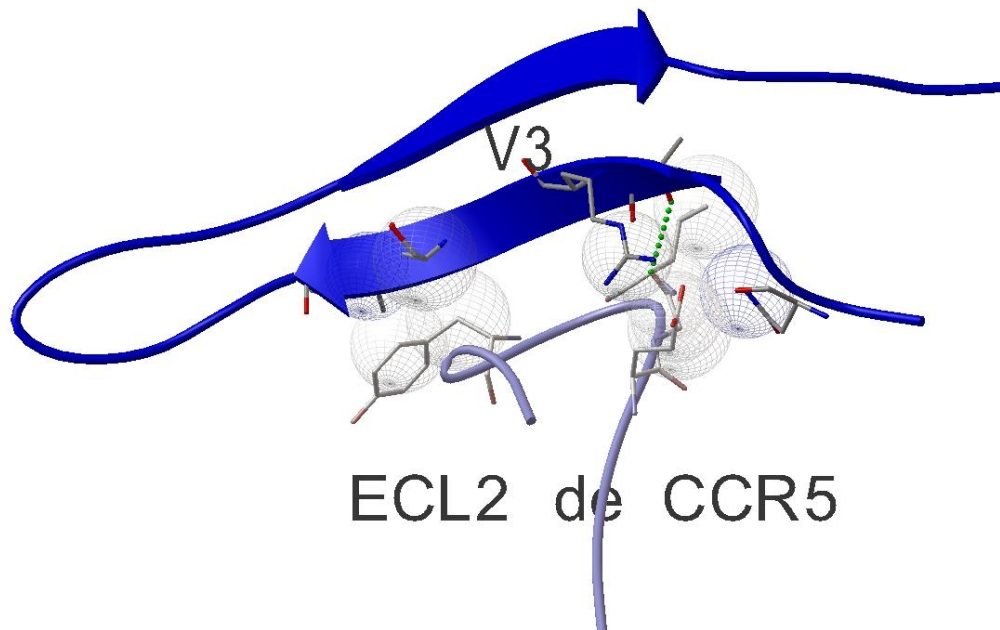
En esta corrida se tomó el archivo V3.pdb como receptor para corroborar las energías de enlace que se pueden dar únicamente entre V3 y ECL2 sin tomar en cuenta el medio global del complejo CCR5-gp120-CD4. Esto tiene la ventaja de que se trata de un modelo teórico ideal diseñado para explorar exclusivamente toda probabilidad de unión que haya en dicha relación, no se han tomado enlaces con rotación aleatoria, por lo que se trata de dos modelos rígidos en choque, tomando en cuenta que los orígenes de ambos archivos (ligando y correceptor) son en el caso del ligando ECL2, un modelo teórico post-enlace con posiciones atómicas confirmadas por métodos de análisis cristalográfico, y en el caso del receptor V3, es un modelo real pre-enlace, también confirmado en todas sus posiciones por cristalografía de rayos X.

Dicha corrida ha consistido de dos fases puesto que el receptor es demasiado grande para ser cubierto en una sola exploración, se le han diseñado dos mallas electrónicas para cubrirlo por completo, una cubre la parte superior de la proteína y la otra la parte inferior, ambas mallas evaluadas con los mismos parámetros de medición. Lo que aquí se presenta es una compilación de los dos resultados obtenidos. Se realizaron 100 corridas de Algoritmo Genético en cada caso. Ambas evaluaciones obtuvieron el mismo resultado.

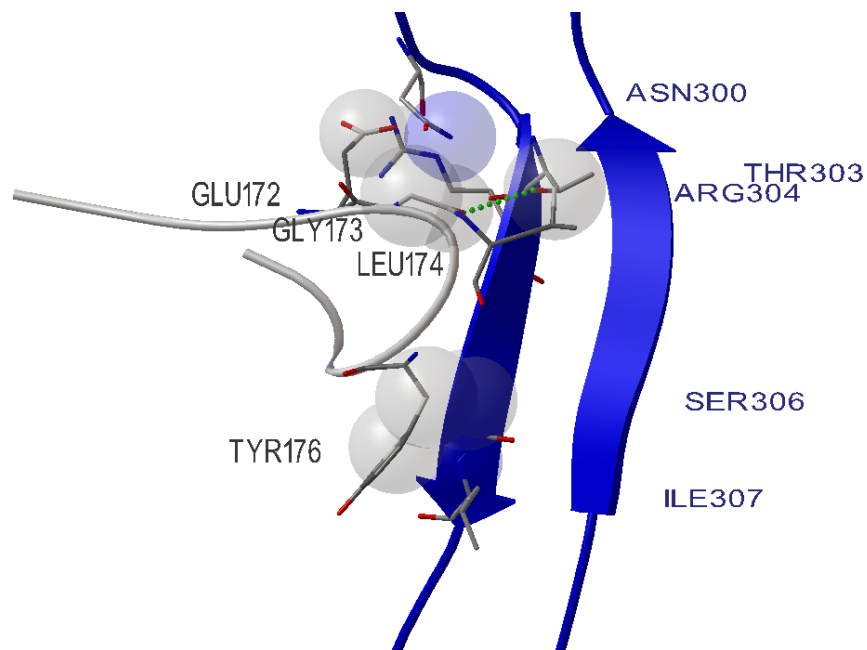
Gráfica No.20



Gráfica No.20: A- CORRIDA 8- MALLA SUPERIOR, Energía de enlace de 100 conformaciones: La gráfica muestra que cuatro conformaciones fueron electas por tener casi la misma energía de enlace más baja como se observa en la barra roja en la gráfica. En las dos corridas realizadas al receptor V3 de gp120 contra el ligando ECL2 se obtuvieron los mismos resultados o con varianzas menospreciables por lo que se puede resaltar la unanimidad en la respuesta del programa ante las dos corridas planteadas.



Gráfica No.20: C- Contexto de interacción en Corrida 8, Rango 1/100: La gráfica representa la situación teórica de la mejor conformación de enlace entre el segmento ECL2 del correceptor CCR5 y el segmento V3 de gp120, la mayoría de las mejores conformaciones de las 200 evaluaciones hechas a este segmento apoyan esta conformación que a pesar de poseer una energía de enlace positiva (5.97 Kcal/mol) se encuentra en un contexto bastante lógico respecto a las propuestas de la conformación post enlace hasta ahora desarrolladas como en el caso de Liu *et al.* (2003). V3 Se representa en color azul y en esquema *Ribbons* mientras que ECL2 se presenta en color lila y en esquema *Ribbons* también. Los choques intermoleculares se señalan con esferas, y los puentes de hidrógeno con líneas punteadas verdes.



Gráfica No. 20: D- Detalle de la Interacción en Corrida 8, Rango 1/100: se aprecia un acercamiento de la mejor interacción en esta corrida. Los enlaces destacados son descritos a continuación: GLU172-ASN300, GLY173-THR303, LEU174 mediante puente de hidrógeno a ARG304, TYR176-SER306, ILE307. El segmento V3 de gp120 ha sido ilustrado en color azul y en esquema *Ribbons*, el segmento ECL2 de CCR5 ha sido descrito en color gris y también en esquema *Ribbons*. Las interacciones han sido señaladas con esferas y los puentes de hidrógeno con líneas punteadas verdes.

Detalles de la Corrida 8

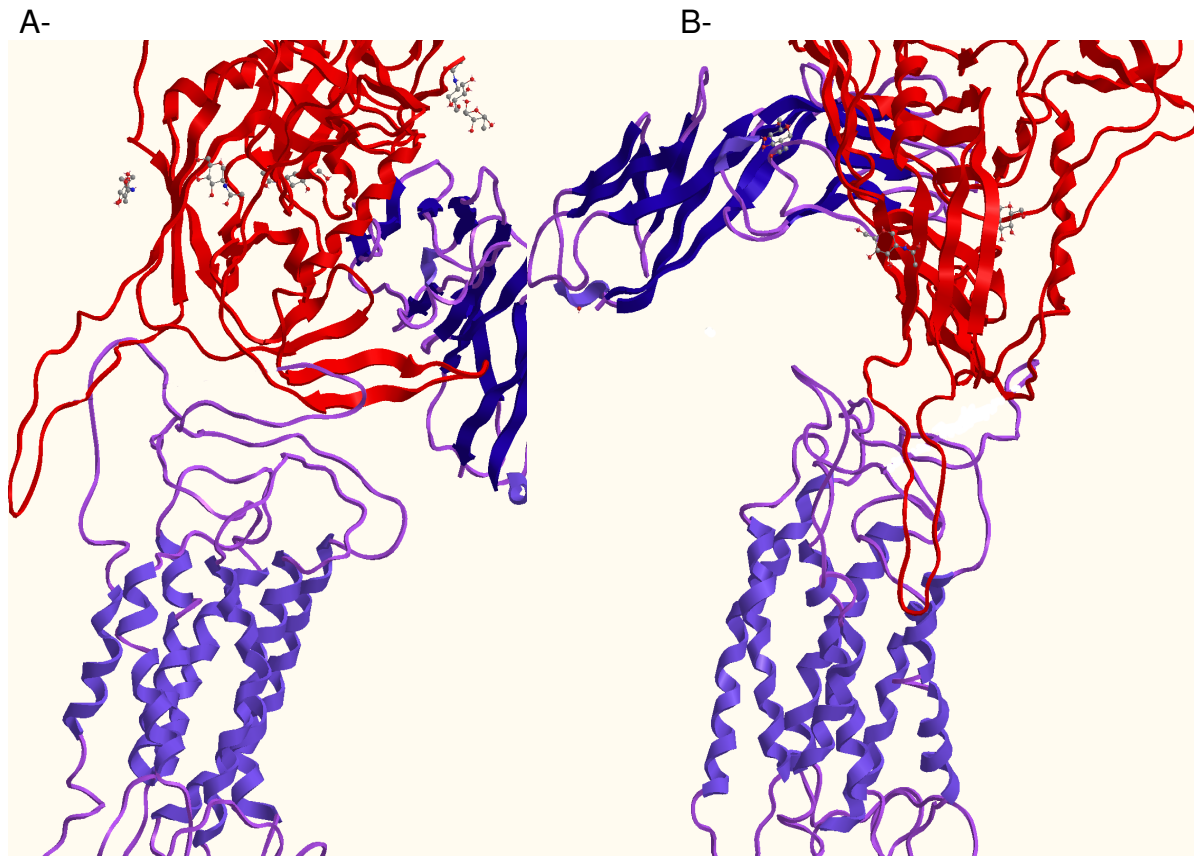
Tabla No.14: detalles de la Corrida 8, Rango 1/100

Propiedad	Rango1/100
Energía de enlace	5.97 Kcal/mol
Energía Intermolecular	-7.15 Kcal/mol
Energía Interna :	0.0 Kcal/mol
Energía Torsional :	13.13 Kcal/mol
Energía Extendida de No Enlace	0.0 Kcal/mol
Cluster RMS:	0.0
Ref RMS:	20.2

RMS: Root Mean Square (raíz cuadrática media)

Cluster RMS: Indica la posición referente a la agrupación de soluciones que se le solicita al programa, en esta situación no se le asignó ningún valor.

Gráfica No.21:



Gráfica No. 21- A y B- Vistas laterales de la unión propuesta entre gp120 de VIH-1 al correceptor CCR5. Es posible observar que la conformación del segmento V3 ha cambiado, que el segmento N-terminal de CCR5 está enlazado a la región V1/V1 cercana a la hoja de enlace en gp120, y que en el caso del segundo segmento extracelular el enlace ha ocurrido a través de los aminoácidos 304-320 de la región V3 en gp120.

9. Discusión

El análisis de cambios conformacionales que sufren los aminoácidos del segmento V3 durante el enlace del complejo CD4-gp120 a CCR5 para formar el complejo CD4-gp120-CCR5, supone al menos tres estados:

Un estado de no enlace que es complejo CD4-gp120, el cual es un complejo intermediario proveniente del cambio conformacional sufrido durante el enlace de CD4 a gp120, dichos cambios conformacionales han sido analizados previamente (159).

En el segundo estado, es un estado intermediario en el que comienza la interacción de CCR5 con gp120-CD4 y donde ocurren cambios conformacionales que inducen la formación del complejo CCR5-gp120-CD4. Para describir tales cambios se debe contar con un amplio conocimiento de la situación de los aminoácidos en gp120 que se disponen a interactuar con CCR5.

El último estado es el estado de enlace o post-enlace que se caracteriza por la formación del complejo estabilizado CCR5-gp120-CD4.

Esta propuesta está de acuerdo con el trabajo desarrollado por Liu S.Q. *et al.* (2003) que es el único dato público que reporta una interacción teórica del complejo gp120-CD4 con CCR5 en la serie de archivos 1OPT.pdb, 1OPW.pdb y 1OPN.pdb en los que se describen tres estados desde el de no enlace de CCR5, un intermediario y una conformación post enlace, estos archivos se encuentran en Protein Data Bank (189, 190)

9.1 Esquema Estructural Desarrollado del complejo CD4-gp120

El Dominio 1 de CD4 es recibido en el interior del núcleo de gp120 donde forma la “cavidad fenilalanina” , enlace que obliga a mover la mayoría de los segmentos de gp120, entre ellos el segmento $\beta 3$ - $\beta 5$ descrito por Sophia Rits-Volloch *et al.* (2006) por ser importante para la exposición de V1/V2 entre el estado ligado y no ligado de gp120.

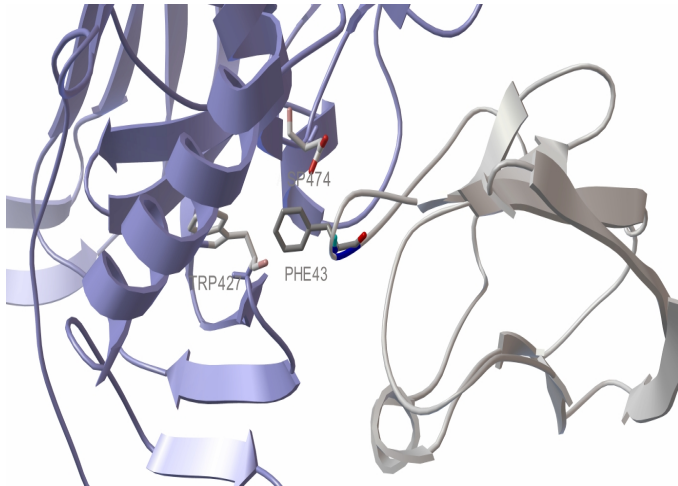
El complejo CD4 – gp120 posee una conformación aceptable como intermediario para la formación del complejo CCR5-gp120-CD4, y está caracterizada por una exposición del sistema V1/V2 perpendicular al segmento V3 que se proyecta 27 Amstrongs lejos de la base donde se encuentra la hoja puente (o la también llamada hoja enlace). Estos datos han sido confirmados con los reportes de Liu S.Q. *et.al.* (2003), en los cuales se establece una distancia de 30 Amstrongs de proyección desde el núcleo de gp120 hasta la cresta de su región V3. Los tres Amstrongs de diferencia entre estos reportes no se consideran una diferencia significativa si se toma en cuenta que la región V3 tiene al menos dos regiones

altamente flexibles, las cuales ha descrito Chin-Chin Huang y sus colaboradores (159,190).

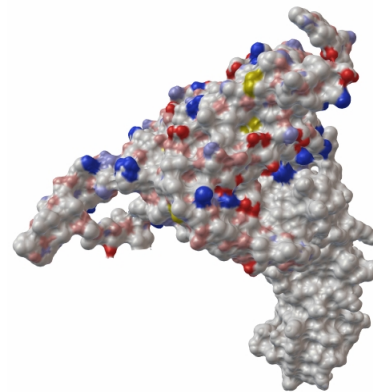
Gráfica No.22:

Descripción del complejo CD4-gp120

A-



B-



A- Esquema que muestra el enlace entre CD4 y gp120, se resalta la PHE43, por ser el aminoácido esencial que le da el nombre a la cavidad formada en este enlace. Además se realzan los aminoácidos TRP427 y ASP474 de gp120 que poseen una relación estérica importante para el enlace con PHE43 de CD4. CD4 se representa en gris, gp120 en morado.

B- Representación del cálculo del área superficial del complejo CD4-gp120. CD4 se presenta de color blanco. Gp120 se presenta en color blanco con manchas azules y rojas que representan las regiones electropositivas y electronegativas de la glicoproteína.

9.2 Determinación del Área de Interacción de gp120 con el Correceptor CCR5 de los Linfocitos T_h CD4⁺

Para recrear el contexto en el que se encuentra el complejo gp120-CD4 previo al enlace del correceptor CCR5 se realizaron una serie de mediciones llamadas “Corridas” cuyos resultados se interpretan a continuación.

Corrida 1 y Corrida 2

En estas corridas se evaluó la interacción de CCR5 (aminoácidos del 7-15) con las áreas de gp120-CD4 descritas como reactivas, las gráficas No.13 C y D muestran las mejores conformaciones encontradas para esta corrida. En la gráfica No.13 C se observa que CCR5 7-15 se ha enlazado en medio de las tres regiones más activas de gp120, donde sobresale TYS14 que forma un puente de hidrógeno con LYS305 que está en la región V3, lo cual provoca la expansión del ligando desde V1/V2 hasta V3.

Es conveniente comparar las energías desplegadas por las corridas 1 y 2, para analizar las situaciones de las conformaciones más estables:

Tabla No. 15: Comparación entre las Corridas 1 y 2

Propiedad	C1 R1/100	C1 R2/100	C2 R1/100	C2 R14/100
Energía de enlace	-3.77 Kcal/mol	-3.19 Kcal/mol	-2.95 Kcal/mol	-1.3 Kcal/mol
E. Intermolecular	-9.25 Kcal/mol	-6.14 Kcal/mol	-8.2 Kcal/mol	-5.7 Kcal/mol
Energía Interna	-11.42 Kcal/mol	-13.94 Kcal/mol	-6.09 Kcal/mol	-6.94 Kcal/mol
Energía Torsional	10.43 Kcal/mol	10.43 Kcal/mol	11.34 Kcal/mol	11.34 Kcal/mol
E. Ext. de No Enlace	-6.47Kcal/mol	-6.47 Kcal/mol	0.0 Kcal/mol	0.0 Kcal/mol
Cluster RMS:	0.0	0.0	0.0	0.0
Ref RMS:	7.2	7.2	11.84	8.99

CxRy/100: Corrida x, Rango y de 100

E. Ext. De No Enlace: Energía Extendida de No Enlace

RMS: *Root Mean Square* (Raíz Cuadrada Media).

Cluster RMS: Indica la posición referente a la agrupación de soluciones que se le solicita al programa, en esta situación no se le asignó ningún valor.

Se observa en la tabla que C1R1 es quien libera más energía de enlace (-3.77Kcal/mol) y quien posee también mejor liberación de energía intermolecular (-9.25 Kcal/mol), seguido por C2R1 con -8.2 Kcal/mol de energía intermolecular, ambas corridas 1 necesitan menos energía para realizar una torsión (10.43 Kcal/mol).

Si la posición de enlace de los aminoácidos 7-15 en la región N-terminal de CCR5 es la que indica la Corrida 1, Rango 1, entonces sería necesario plantearse la situación en la que debería de entrar el segundo segmento extracelular de CCR5

para contactar con el segmento V3 de gp120, ya que como se observa en la Tabla No.18 en la Corrida No.8 las mejores posiciones reactivas de ECL2 en CCR5 contra V3 en gp120 se encuentran en la misma región que en la Corrida 1 Rango 1, en otras palabras, CCR5 7-15 desplazaría por impedimento estérico a ECL2 en CCR5, lo cual sería posible si la energía global de enlace fuera menor, pero los enlaces de ECL2 de CCR5 a otras regiones de V3 en gp120 como la cresta de V3 por ejemplo, aumentan hasta 3 y 4 veces su valor de energía de enlace como se observa en las corridas posteriores.

Datos adicionales que genera el mismo programa Autodock se presentan a continuación para C1R1 y C2R1;

Tabla No.16: Datos adicionales de las Corridas 1 y 2

Propiedad	C1R1/100	C1R2/100	C2R1/100
Eficiencia del ligando	-0.07 Kcal/mol	-0.06 Kcal/mol	-0.05 Kcal/mol
Constante de inhibición	1.12 mM	4.63 mM	6.87 mM
Energía Interna total	-11.42 Kcal/mol	-13.94 Kcal/mol	-6.09 Kcal/mol
Energía interna del ligando	-5.61 Kcal/mol	-7.73 Kcal/mol	-4.14 Kcal/mol
Energía Interna del Receptor	5.61 Kcal/mol	-6.02 Kcal/mol	-1.94 Kcal/mol
Energía Electrostática	-4.26 Kcal/mol	-1.61 Kcal/mol	-3.14 Kcal/mol

CxRy/100: Corrida x, Rango y de 100

Estos datos confirman que C1R1 es la mejor conformación encontrada en estas dos corridas, aunque el índice de eficiencia del ligando (que es una relación energética total del contacto del mismo con la molécula receptora) es menor para C1R1 que para C2R1, la energía interna total del sistema es casi 6 Kcal/mol

menor en la comparación de ambos rangos, así como la energía interna del ligando en C1R1 que confirma este dato.

La Corrida 2 ha desplegado una serie de interacciones donde la mayoría de las mejores soluciones se basan en un contacto de CCR5 7-15 con las posiciones aminoacídicas 322-432 en gp120, y todas estas interacciones son finalmente menos favorecidas energéticamente (en lo que a energía de enlace se refiere) que las interacciones desplegadas en la Corrida 1.

C1R2 es una solución notable en la que se establecen interacciones entre TYR15-LYS205, TYS14-PRO306 y ASN13 que permanece estabilizando a la relación TYS14-PRO206, resultado que es coherente por lo reportado Liu S.Q. *et.al.* (2003) (190).

Este resultado de C1R1, donde se establece la interacción de CCR5 7-15 cercana a V3, también puede ser comparado con los resultados reportados por Chin-Chin Huang, quien apoya el hecho de que CCR5 7-14 interactúa plenamente con V3 y su base, siendo fuertemente atraído CCR5 7-15 por la región de la hoja de enlace y sin tener una interacción significativa con el sistema V1/V2.

En cambio, el estudio de Liu S. Q. *et.al.* (2003) en su experimento de modelaje molecular teórico se establece que el segmento CCR5 7-15 interactúa en pleno con el sistema V1/V2 y es fuertemente atraído por la hoja de enlace, pero permanece CCR5 completo en un contexto que explica también la interacción que

CCR5 tiene con gp120, en este archivo 1OPW.pdb la interacción del segmento ECL2 de CCR5 con V3 no es propuesta pero sí sugiere su orientación.

Basándose en los reportes anteriores y tomando en cuenta los resultados obtenidos en la presente evaluación, se puede inferir lo siguiente:

1- que definitivamente la región de la hoja de enlace ejerce una atracción muy fuerte sobre CCR5 7-15.

2- que la sección V1/V2 atrae a CCR5 7-15 y es capaz de orientar y muy probablemente es capaz de formar un complejo estable V1/V2 y hoja de enlace con CCR5 7-15, siempre y cuando guarde una lógica conformacional y energética con todo el correceptor CCR5.

3- En cuanto al segmento V3, se sugiere que podría actuar como un orientador, puesto que LYS305 forma un importante puente de hidrógeno con TYS14 de CCR5, pero para afirmar dicha interacción es necesario observar primero el comportamiento de la segunda región extracelular de CCR5.

4- El papel de ARG440 en la hoja puente es sumamente importante para la atracción del correceptor y probablemente para su enlace también, el problema en el análisis al rededor de ARG440 es que es una arginina tan activa que atrae por

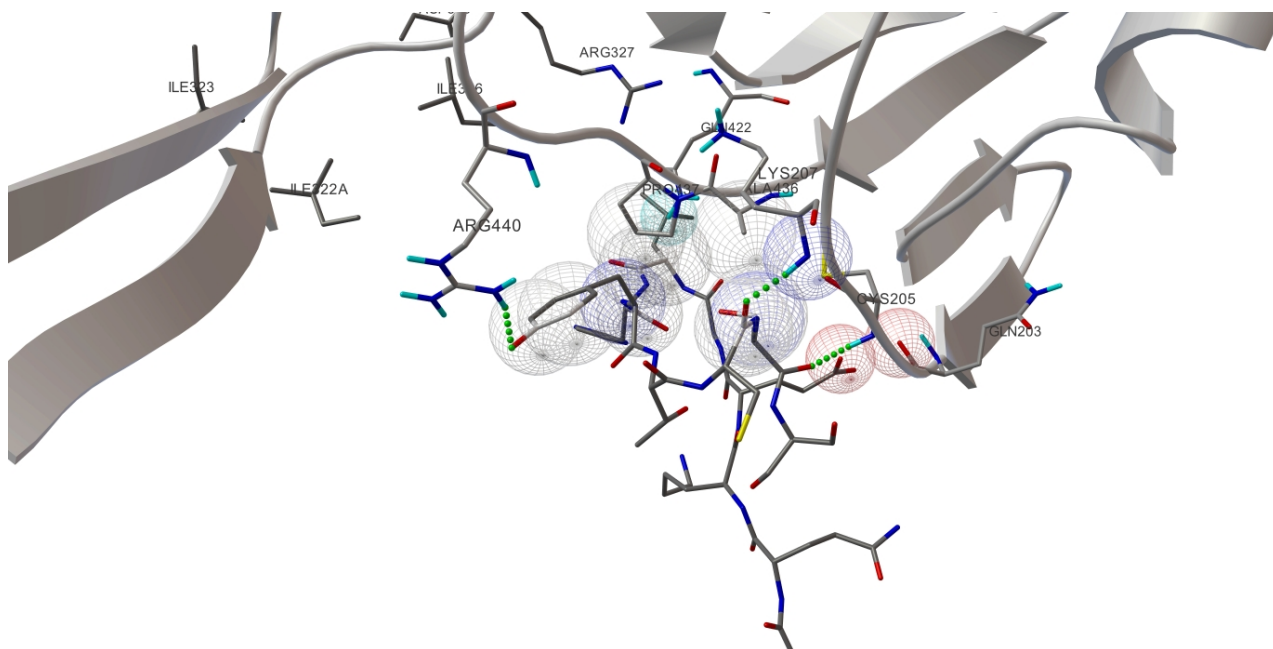
igual a ECL2 como se verá mas adelante, lo que hace necesario utilizar más datos para concluir certeramente cual es su interacción formal.

Es importante hacer notar que aunque el segmento N-terminal 7-15 de CCR5 no interactúa directamente con V3 e incluso con la hoja puente, el simple acercamiento de CCR5 7-15 a esta región puede tener la energía potencial necesaria para activar las conformaciones necesarias en el segmento V3 y en la hoja de enlace, lo cual prepararía a estas regiones para interactuar con cualquier otra región en CCR5.

Corridas 3, 4 y 5

En estas corridas se evaluó la interacción de ECL2 con todas las regiones activas gp120 concernientes a CCR5, la diferencia entre estas corridas fue el nivel de torsiones y grados de libertad en la rotación de los enlaces en ECL2. En la Corrida 3 no se permitió torsiones aleatorias significativas. En la Corrida 4 si se permitió las torsiones de la cadena peptídica para analizar a fondo la función de los aminoácidos del segundo segmento extracelular de CCR5 que son descritos junto a los aminoácidos de la región N-terminal como los más importantes en CCR5 para su interacción con gp120. En la Corrida 5 la cadena peptídica de ECL2 permaneció fija mientras que a las cadenas R laterales se les otorgó torsiones flexibles y además se observó su interacción específica con la hoja de enlace y con el segmento V1/V2 de gp120. Los resultados obtenidos son analizados a continuación:

Gráfica No.23: Interacción en la Corrida 3, Rango 1



Interacción en la Corrida 3, Rango1: Se puede observar que para la Corrida 3 el resultado ha sido invariable al analizar las 100 soluciones propuestas por Autodock para esta corrida, se observó que la mayoría coincidía con la posición que se muestra en C3R1/100, lo cual sugeriría como único punto de enlace a la hoja puente y a la región V1/V2 en gp120. Sin embargo al observar los datos de la relación energética que desarrolla C3R1 llama la atención la relativamente baja energía de enlace comparada con los resultados obtenidos en la Corrida 4. Además es necesario recalcar que mientras que en C3R1 se ha obtenido una energía de enlace de -1.41 Kcal/mol, en las Corrida 1 Rango 1/100 y Rango 2/100 (C1R1/100 y C1R2/100) la energía de enlace fue de -3.77 y -3.19 Kcal/mol respectivamente y en la misma región, lo cual da en todo caso una clara preferencia al enlace de la región CCR5 7-15 N-terminal por sobre el segmento ECL2 en cuanto a la hoja de enlace y a la región V1/V2 se refiere, suponiendo que por impedimento estérico entre las regiones ECL2 y CCR5 7-15, ECL2 ha de orientarse a una probable interacción con V3 o bien puede ser que la región CCR5

7-15 sufra un desplazamiento de la hoja de enlace hacia V1/V2, justificado este movimiento en una mejora en la relación de energía de enlace total de la interacción completa entre gp120 y CCR5.

Es necesario recordar que no es el fin prioritario de este estudio determinar las posiciones de enlace exactas entre gp120 y CCR5 pues estos estudios ya han sido realizados, pero si es el fin de esta investigación plantear un mecanismo de reacción entre la región V3 y CCR5 lo cual conlleva los presentes análisis.

Tabla No.17: Comparación entre las Corridas 3, 4 y 5

Propiedad	C3R1	C4R1	C4R2	C4R3	C4R4	C4R8	C4R9	C5R1	C5R2
Energía Enlace	-1.47	-4.58	-4.22	-3.68	-3.57	-2.86	-2.83	-0.81	0.4
Energía Intermolecular	-6.74	-6.14	-7.96	-6.9	-5.48	-3.85	-3.65	-7.76	-6.81
Energía Interna	-7.86	-11.57	-9.39	-9.91	-11.22	-12.14	-12.3	-6.17	-6.27
Energía Torsional	13.13	13.13	13.13	13.13	13.13	13.13	13.13	13.13	13.13
Energía Extendida de No Enlace	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cluster RMS	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ref RMS	7.24	6.62	15.54	12.1	9.67	5.82	9.6	7.2	7.2

CxCy: Corrida x, Rango y/100

Todas las energías han sido medidas en Kcal/mol

RMS: *Root Mean Square* (Raíz Cuadrada Media).

Cluster RMS: Indica la posición referente a la agrupación de soluciones que se le solicita al programa, en esta situación no se le asignó ningún valor.

La tabla No.8 es una comparación de datos donde C3R1 pertenece a una interacción de gp120 con un ECL2 rígido mientras que los demás datos C4

pertenecen a un ECL2 flexible en su cadena peptídica y los datos C5 a una interacción de ECL2 flexibles en su cadena lateral R.

C4R1 se ha distribuido entre las tres regiones más reactivas de gp120 (hoja de enlace, V3 y V1/V2) mostrando dos puentes disulfuro entre CYS178 de ECL2 y CYS205 de gp120, además de un puente de hidrógeno importante entre ARG440 y TYR176, teniendo invadida la región V3 por impedimento estérico, lo importante de esta corrida es observar la estabilidad del enlace adquirido por la formación de los enlaces antes mencionados, siendo de importancia para ECL2 CYS178 y TYR176.

Tanto las conformaciones observadas en C4R1 como en C4R2 son poco probables como se ha señalado, por el impedimento físico que representa para ECL2 en contexto con CCR5, el caso de C4R2 se considera un ejemplo de dato descartable, puesto que ni su conformación es real, ni tampoco su interacción química está ubicada en los sitios de interés.

En el caso de C4R3 es interesante observar el posicionamiento que alcanza nuevamente CYS178 con CYS205, en donde a pesar de que según la gráfica No.14 D- no se reporta una interacción directa entre estos aminoácidos, estos quedan bien orientados, además solamente se han aplicado movimientos torsionales a las cadenas peptídicas de ECL2 y no a sus cadenas R laterales, lo cual implica que en una interacción real es probable el contacto directo entre estas cisteínas.

En cuanto a C4R4 es posible observar nuevamente el papel que desarrolla CYS178 sobre ARG440, aminoácidos que presentan un contacto distante que contribuye a la estabilidad del conformero, luego es posible distinguir interacciones importantes en la región de aminoácidos GLN170, LYS171, GLU172, GLY173 con la región de V3 TYR318, THR319, GLY321, GLU322, donde además se guarda en ECL2 una conformación arqueada semejante a la presente en ECL2 en estado nativo, lo cual realza su importancia como posible solución a la interacción real entre ECL2 y V3.

C4R8 fue escogida por su conformación arqueada que es muy similar a la presente en ECL2 en su estado nativo, es aún más semejante que su homóloga C4R4 discutida previamente, de hecho la posición en la que se presenta respecto a gp120 es como la que se esperaría que tuviera en una interacción real, e interactúa directamente con la región V1/V2 de gp120, sin embargo su energía de enlace es la menor de todas las presentadas en esta serie de la Corrida 4, y su energía interna (-6.13 Kcal/mol³) es una de las más estables de todas las conformaciones presentadas lo cual es interpretable como una confirmación de la estabilidad de la conformación nativa.

C4R9 también fue escogida por su gran relación conformacional con el estado nativo de ECL2, sin embargo se encuentran dos obstáculos en esta solución, uno es la interacción directa entre ECL2 y V3, en este Rango CCR5 sufre mayor impedimento estérico, el otro obstáculo es la difícil orientación en la que se obliga al correceptor CCR5 a interactuar, lo cual va de la mano con la relativamente baja

³Dato no presentado en tablas, fue calculado por el programa Autodock 4.01

energía de enlace alcanzada (novena posición de 100 en esta corrida). La energía interna del ligando es -7.04 Kcal/mol ³.

C5R1 posee una de las energías de enlace más bajas dentro de este grupo de comparaciones, los datos aportados por C5R1 y C5R2 apuntan al hecho de que definitivamente el segundo segmento extracelular ECL2 de CCR5 no tiene una interacción real con el segmento V1/V2 de gp120 lo cual crea una concordancia con el trabajo presentado por Liu S. Q. Y sus colaboradores en 2003 (190).

Únicamente es necesario recalcar en esta corrida que C5R1 y C5R2 tienen ligandos ECL2 con cadenas peptídicas rígidas lo cual presenta cierta desventaja en este modelo de enlace teórico respecto a una interacción real, aunque en tal caso, la Corrida 4 demostró ampliamente que de igual manera el área de V1/V2 era de bajo interés para la sección ECL2 de CCR5.

En un resumen de las corridas 3,4 y 5 se puede decir que las conformaciones C4R4 y C4R9 sobresalen demostrando que a pesar de la absoluta movilidad de la cadena peptídica concebida a ECL2, las más bajas energías conformacionales de este ligando calzan con la conformación del estado nativo de ECL2 y en interacción con V3, hecho que es de suma importancia. Otras energías de enlace más bajas han sido obtenidas en las regiones V1/V2 y la hoja de enlace, pero sin una conformación estructural lógica en ECL2, y en las corridas C3R1 donde la conformación de ECL2 no varía, se han reportado energías de enlace menores a -1.41 Kcal/mol .

³Dato no presentado en tablas, fue calculado por el programa Autodock 4.01

Por otro lado la Corrida 5 sirvió para constatar la baja competitividad que presenta el segmento ECL2 en una interacción directa con V1/V2 tomando en cuenta que se trata de un modelo de enlace teórico.

Corridas 6 y 7

Las Corridas 6 y 7 estuvieron orientadas a encontrar interacciones específicas entre las regiones activas de CCR5 y el segmento V3, para lo cual se tomó únicamente este segmento de gp120 y se hizo enlazar a las dos regiones extracelulares más importantes de CCR5, la región N-terminal y ECL2, con lo cual se busca en primer lugar confirmar las soluciones obtenidas en las corridas anteriores, y en segundo lugar poder realizar una interacción directa de V3 en un modelo ideal libre de cualquier impedimento estérico que pueda provocar la conformación nativa o no nativa de gp120.

En la tabla próxima se presenta una comparación de los resultados obtenidos de las evaluaciones de ambas corridas:

Tabla No.18: Comparación entre las Corridas 6 y 7

Propiedad	C6R1	C6R13	C6R14	C7R1	C7R13
Energía de enlace	11500000.0	11500000.0	11500000.0	22.12	22.43
Energía Intermolecular	-4.06	-3.04	-2.12	-7.16	-7.3
Energía Interna :	11500000.0	11500000.0	11500000.0	-0.4	-0.39
Energía Torsional :	30.13	30.13	30.13	30.13	30.13
E. Ext. de No Enlace	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cluster RMS:	0.0	0.0	0.0	0.0	0.88
Ref RMS:	28.64	28.64	25.88	16.46	16.38

CxRy: Corrida X, Rango y/100

RMS: *Root Mean Square* (Raíz Cuadrada Media)

E. Ext. De No Enlace = Energía Extensible de No Enlace

Todas las energías están medidas en Kcal/mol

Cluster RMS: Indica la posición referente a la agrupación de soluciones que se le solicita al programa, en esta situación no se le asignó ningún valor.

En la Corrida 6 la energía de enlace y la energía interna de todas las soluciones fue 11500000.0, dato que es incoherente por lo cual se descarta, el motivo que pudo ocasionar este error es una mala posición de la malla electrónica, lo cual obligaría a que durante las interacciones el ligando topara con la malla, circunstancia en la cual, estos datos pueden encontrar una explicación. Sin embargo es posible evaluar las comparaciones mediante la energía intermolecular desplegada, en tal caso, la Corrida 6 rango 1 es la solución energética más favorable, pero su posición física está fuera de contexto respecto a la interacción propuesta previamente por Liu S. Q. *et. al.* 2003. (Observar la Gráfica No. 18:C).

La Gráfica No.18: D ofrece mayor detalle acerca de esta interacción donde lo importante es observar cómo actúa la cresta de V3 gp120 con ECL2, si bien esta no es necesariamente la solución acertada al enlace V3-CCR5, bien puede ser una sugerencia del tipo de interacción que desarrollan ambos segmentos siendo liderados por PRO169 que se encuentra en la parte superior del segundo segmento extracelular, al igual que PRO183 y TYR184 por parte del mismo segmento, que entran en contacto con TYR318, ILE309 y PRO313 de V3 respectivamente.

En C6R13 se puede observar que la interacción se encuentra localizada hacia la parte media de V3 principalmente por los aminoácidos GLY 321, TYR 318 y GLY314 que reaccionan con los aminoácidos de CCR5 HIS175, LIS171, ARG168. Esta es la primera interacción coherente en el contexto del complejo CCR5-gp120-CD4 encontrada en la Corrida 6 y es necesario recalcar que se encuentra en la posición 13 en relación a la energía interna, lo que hace necesario realizar más análisis para corroborar este dato. Los datos de la Corrida 6 por tanto deben ser analizados en conjunto con la corrida 8 en la cual se tomó únicamente a los segmentos V3 de gp120 y ECL2 de CCR5 en una interacción ideal que utilizó a V3 como ligando y a ECL2 como receptor (ver el análisis de la corrida 8).

En C6R14 la interacción es sumamente semejante a la desplegada en C6R13, donde resalta el hecho de que a pesar de que hay una mayor interacción entre V3 y ECL2, disminuye la cantidad de energía intermolecular liberada siendo de -2.12 Kcal/mol en comparación a -3.04 Kcal/mol desplegadas por C6R13. Las

interacciones en C6R14 son: ARG304 - HIS175; ILE323-HIS175, GLU322-HIS175, THR320-LYS171, ASN308-GLN170 (Observar la Gráfica No.18: F).

En cuanto a la corrida 7, las soluciones tomadas C7R1 y C7R3 ayudaron a entender los resultados encontrados por Chin-Chin Huan *et.al.* (2005), en los que se establece una interacción entre CCR5 7-15 y el segmento V3.

C7R1 es en efecto la conformación mejor favorecida en cuanto a energía de enlace, pero al analizar la posición de V3 en contexto con CCR5 se observa que V3 se interna en la región de membrana de CCR5 lo cual no debe suceder, y además la región N-terminal de CCR5 se incrustaría en el núcleo de gp120 lo cual no ha sido reportado.

C7R3 establece una solución interesante en la que V3 no solamente interacciona con el segmento N-terminal de CCR5 sino también con el primer segmento extracelular, en una región que esta muy cerca de la propia región intracelular de CCR5 pero no en ella. Esta solución despliega una energía de enlace de 22.43 Kcal/mol lo cual es un nivel de energía considerable en comparación a las corridas anteriormente evaluadas, e implica que el ligando y el correceptor deben absorber esta energía para formar los enlaces y puentes de hidrógeno referentes a su interacción, lo cual es posible dentro del medio celular, pero no es favorable energéticamente, este punto es de ser tomado en cuenta durante la evaluación de la Corrida 8 antes de albergar una conclusión. Las interacciones que se observan en la Gráfica No. 19: D son THR303,LYS305, ILE309 - TYR3; GLY314- LEU277; ARG315-SER272, ASN278; PRO313-ASN273.

Corrida 8

En la corrida número 8 fue evaluado el papel de ECL2 al interactuar con V3 en un modelo teórico ideal, lo cual significa que no se han tomado en cuenta ninguna de las otras secciones de ambas proteínas, únicamente se trata de esclarecer el papel específico de V3 en ECL2 de CCR5, para lo cual se diseñaron dos mallas electrónicas que cubrieron por completo a V3 que fue el receptor de la interacción, mientras que ECL2 permaneció como ligando.

El resultado de ambas mallas fue el mismo, por lo que 200 interacciones se pueden resumir a una representativa, lo cual fortalece dicha respuesta, y es presentada en la gráfica No.20: C.

La tabla de energías relacionadas a C8R1 muestra una energía de enlace de 5.97 Kcal/mol, que es considerablemente más baja que las 22.43 Kcal/mol requeridas en C7R13 o C7R1, sin embargo, las circunstancias de interacción no son las mismas puesto que en las otras corridas si se encuentran por completo al menos una de las proteínas que intervienen, por lo que conviene hacer un resumen comparativo de las interacciones de otras corridas semejantes a la Corrida 8:

Tabla No.19: Comparación entre las corridas relacionadas con la interacción entre ECL2 de CCR5 y V3 de gp120

Propiedad	C8R1	C7R3	C6R13	C6R14	C4R4/100	C4R9/100
Energía de enlace	5.97	22.43	11500000.0	11500000.0	-3.57	-2.83
Energía Intermolecular	-7.15	-7.3	-3.04	-2.12	-5.48	-3.65
Energía Interna :	0.0	-0.39	11500000.0	11500000.0	-11.22	-12.3
Energía Torsional :	13.13	30.13	30.13	30.13	13.13	13.13
E. Ext de No Enlace	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cluster RMS:	0.0	0.88	0.0	0.0	0.0	0.0
Ref RMS:	20.2	16.38	28.64	25.88	9.67	9.6

RMS: *Root Mean Square* (Raíz Cuadrada Media)

Todas las energías han sido estimadas en Kcal/mol.

E. Ext de No Enlace: energía extendida de no enlace.

Cluster RMS: Indica la posición referente a la agrupación de soluciones que se le solicita al programa, en esta situación no se le asignó ningún valor.

Diferencias entre las corridas que se presentan en la Tabla No.19:

C4: ECL2 es flexible en cadena peptídica y se presenta contra gp120 completo

C6: V3 rígido contra ECL2 en CCR5 completo y rígido también

C7: V3 rígido contra N-terminal en CCR5 completo y rígido también.

C8: V3 rígido contra ECL2 en un modelo teórico ideal.

En la Tabla No.19, la Corrida 7 demuestra fácilmente que posee una desventaja energética respecto a las demás corridas en la tabla. Incluso la comparación entre la Corrida 7 rango 3 contra las dos Corridas 6 Rangos 13 y 14 aventajan a la Corrida 7 en cuanto a la Energía Intermolecular desplegada (por una diferencia de 4 y 5 Kcal/mol) lo que deja en claro que el segmento N-terminal en CCR5 es

desplazado en la competencia de enlace de las dos regiones de CCR5 por V3 de gp120 en función de la formación de un complejo energéticamente estable.

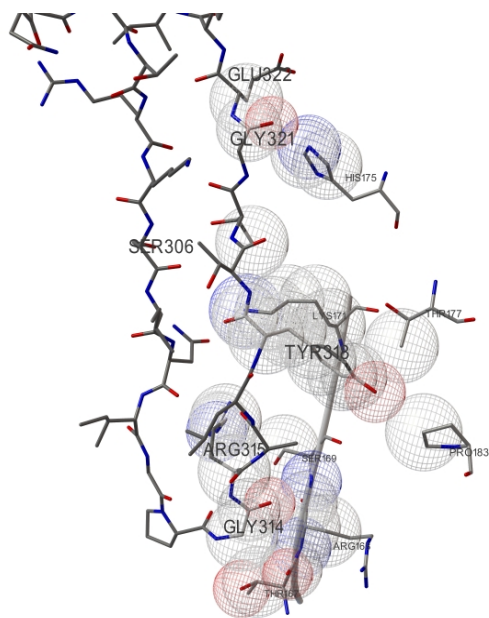
En una comparación entre las Corridas 6 y 8 se puede obtener datos para aclarar los puntos exactos en los que reaccionan la región V3 de gp120 con ECL2 en el correceptor CCR5, apoyándose también en los datos que aporta la Corrida 4 que deben de describir los detalles mínimos de las conformaciones que se deben de alcanzar en ambas regiones. C6 y C8 deben ser coherentes en la interpretación de esta conformación. La conformación más favorecida energéticamente de estas interacciones es C8R1 cuyas interacciones en las posiciones 300-307 de la región V3 se dan con los aminoácidos 172-176 de ECL2, lo cual es muy semejante a la interacción que muestra C6R14 con enlaces entre las posiciones 302, 304 y 308 en V3 que entra en contacto con las posiciones 169, 170, 171 y 175 de ECL2, lo cual indica que la región media de V3 dominada por los aminoácidos 300-308 es la encargada de realizar una interacción específica y muy probablemente los aminoácidos 314 y 315 que se encuentran en la cresta del segmento V3 sean los encargados de la orientación primaria durante el enlace del segmento V3 a al segmento ECL2 asumiendo que exista un enlace posterior formal. Lo cierto es que la regla 11/25 establece un reconocimiento entre cepas X4 y R5 y sus respectivos correceptores.

11/25 se refiere a las posiciones 306 y 322 en V3 de gp120 en el archivo CD4-gp120 (las posiciones variarán según la cepa de VIH utilizada) y establece que si estas posiciones están cargadas positivamente, el virus usará el correceptor CXCR4; en cualquier otra combinación utilizará el correceptor CCR5 (Chin-Chin

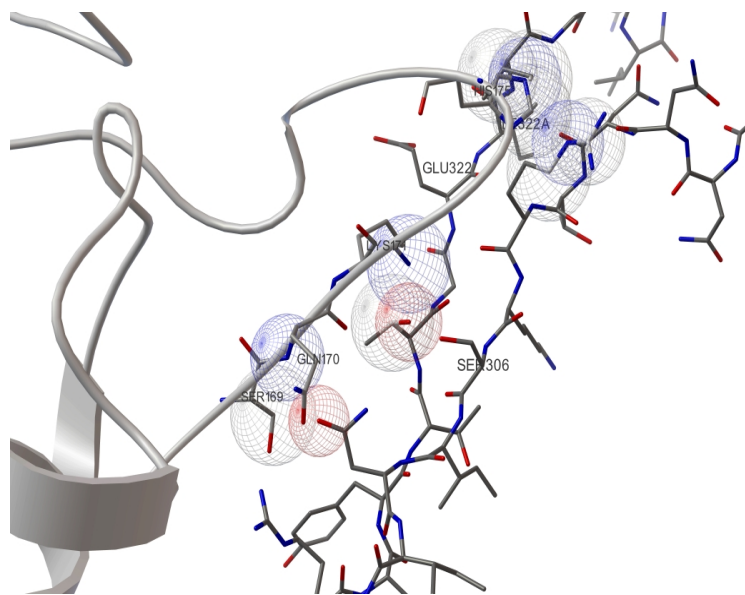
Huang). Ambas posiciones (306 y 322) se encuentran en la región media de V3 que ha sido determinada como epítopo de reacción por C6R14, en los rangos de la Corrida 6 no se detalla tal interacción exactamente, pero es necesario recordar que ambas cadenas laterales R en la Corrida 6 permanecieron rígidas. Un análisis gráfico de las interacciones de Van der Waals de ambas cadenas demuestra que en efecto, en la corrida 6, rangos 13 y 14 no existe una interacción en los aminoácidos de posición exacta 306 y 322, pero sí hay interacciones para C6R1 en 309/318; para C6R13 en 314, 321 y para R6C14 304, 308, 320 y 323. Una razón probable de esta inexactitud es la rigidez conformacional a la que están limitadas las interacciones en el programa Autodock 4.

Gráfica No.24: Análisis de las interacciones moleculares en C6R13, C6R14 y C8R1

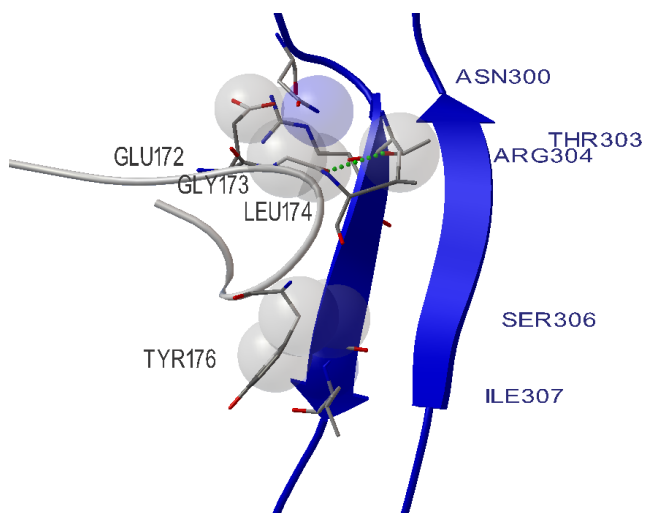
A-



B-



C-



A- Imagen que detalla las interacciones moleculares en C6R13.

B- Imagen que detalla las interacciones moleculares en C6R14.

C- Imagen que detalla las interacciones moleculares en C8R1.

En C8R1 si existe una interacción directa de SER306 con ECL2, C8R1 tiene una interacción con V3 muy completa, lo cual debe ayudar a la gran estabilidad en la que resulta su energía de enlace.

Tampoco se descarta la posibilidad de que las posiciones 306 y 322 en el segmento V3 orienten al segmento ECL2 de CCR5 durante el proceso de enlace sin la obligatoriedad de que exista una interacción específica en el complejo final, pues al parecer otros aminoácidos como los presentes en la cresta del segmento ECL2 tienen una función de orientación también antes que de enlace, y hay que recordar que precisamente los aminoácidos que se encuentran en la cresta del segmento V3 (la secuencia PGRAFY) son los más invariables de esta región variable.

En resumen para la Corrida 8, se puede describir a la secuencia de aminoácidos 300-308 en la región V3 de gp120 como los responsables de la interacción directa con la región ECL2 presente en CCR5, lo cual permite interpretar también que deben existir en la región V3 otros aminoácidos cuya función es orientar al segmento ECL2 durante el proceso de enlace. Además es necesario observar que es posible la formación de más de un tipo de enlace en V3 dada la alta reactividad que presenta esta región esencialmente en las posiciones ya mencionadas 300-308, pero además en las regiones 317-324 la cual es una región altamente flexible.

Por otra parte lo anterior implica que la región N-terminal debe ser la encargada de reaccionar directamente con las regiones de hoja de enlace y V1/V2 presentes en gp120 de VIH-1, encontrando como principales regiones reactivas ARG440 y los aminoácidos en posición 208-200 quienes entran en contacto con los aminoácidos de CCR5 7-15.

Un análisis minucioso entre las gráficas de las interacciones en C8R1 y C4R4, ambas referentes al encuentro entre ECL2 de CCR5 y V3 de gp120 en complejo con CD4, muestran dos sitios esenciales de reacción, uno, el ya discutido en C8R1 donde los aminoácidos participantes de V3 son la región 300-305, en el otro caso C4R4 muestra una región opuesta de interacción en V3, la región 318-322 y 305. En C4R4 se ha permitido la flexibilidad absoluta de la cadena peptídica de ECL2, y eso explica también las bajas energías de enlace obtenidas referente a esta corrida, aunque la energía intermolecular no ha sido mejor que en C8R1, la energía interna (-11 Kcal/mol contra 0.0 Kcal/mol desplegadas en C8R1) se explica también por la misma flexibilidad concedida en la libertad de torsiones a esta cadena peptídica ECL2 en C4R4, pero esto también la aleja un tanto de la realidad conformacional posible para ECL2. La corrida 4 se diseñó con el objetivo de observar las preferencias de enlace particular de cada aminoácido en ECL2, y esta información indica que las mejores interacciones en ECL2 las tienen las posiciones aminoacídicas 169-173 que han sido una región de alto contacto, por lo que es de esperarse que en una interacción real de ECL2 contra V3, esta sea la región que busque interactuar con V3 de gp120, de hecho, al observar C8R1 los aminoácidos que interactuaron por parte de ECL2 fueron las posiciones 172-174 y 179, lo que confirma que el par 172-173 de ECL2 es sumamente importante en su reacción para estabilizar el producto complejo ECL-V3. Por otro lado, en V3 de

gp120 el aminoácido LYS305 ha sido el único común entre C4R4 y C8R1. Luego se observa que las dos áreas opuestas a lo largo de V3 son muy reactivas para ECL2 alcanzando menor energía intermolecular C8R1 con el contacto en la región 300-305 en comparación a C4R4 que presenta una interacción en la región 318-322 de V3 pero con una diferencia poco significativa, el impedimento en realidad es de tipo conformacional para C4R4.

Observando nuevamente la regla 11/25 puede sugerir este dato que cuando las posiciones 11 y 25 de V3 están cargadas positivamente entonces la cepa se comporta como X4 porque ECL2 puede arribar al choque con V3 por cualquiera de los dos lados y encuentra la misma respuesta. Esta explicación sería consistente con el hecho de que, para cepas X4/R5, lo que sucede es que uno de ambos aminoácidos en posición 11 ó 25 se encuentra cargado positivamente, de manera que si ECL2 se acerca por el lado positivo, la cepa se comportará como X4, mientras que si arriba por el lado negativo se comportará como R5, y si ambos lados, el 11 y el 25 se encuentran cargados negativamente o neutro, la cepa que reaccionaría sería únicamente R5. En conclusión en V3 existe más de un sitio en donde puede interactuar con ECL2, por lo que existe la formación de diferentes epítopos inducidos en V3 para los correceptores CXCR4 y CCR5 (194).

Esta conclusión permite proponer una mecánica de interacción de V3 con ECL2. Siendo consistente con los tres modelos teóricos planteados por Liu S.Q. Y sus colaboradores, el segmento N-terminal es el primero en encontrar al segmento V1/V2 y la hoja puente de gp120 comenzando la interacción entre el complejo CD4 y gp120, lo siguiente es el acoplamiento de esta cadena de aminoácidos, este momento exacto sería un intermediario previo al entrar en contacto con el

segmento ECL2 y según la regla 11/25 y los argumentos previamente explicados, podría encontrarse CD4-gp120 en un movimiento relativo a CCR5 al que se encuentra semi unido por un pivote de giro que sería el segmento CCR5 N-terminal unido a V1/V2, pero este movimiento de incertidumbre caracterizará la próxima interacción según el lado en que arribe V3 al segmento ECL2 de CCR5, el cual también podría estar regido por el campo energético de los aminoácidos de la región V3.

Al realizar una comparación con los resultados obtenidos por Paul R. Gorry (2007) (195) los aminoácidos importantes en V3 de gp120 son TYR308, ASP321/ILE317 (aparte de LYS442, GLU444 y TYR330 que están en otras regiones de gp120). Estas posiciones 308, 321 y 317 son semejantes a las reportadas en R6C1, R6C13 y C6R14. Estos resultados señalan que no hay una interacción específica entre ECL2 y V3, pero si se puede decir que V3 no solo es altamente afín a ECL2 sino que parece estar diseñado de tal manera que ofrece un epítopo de contacto diferente según la situación en que se encuentra al enlazar a ECL2, distinguiendo tres áreas importantes en V3:

- a- las posiciones 300-305,
- b- las posiciones 307-308,
- c- las posiciones 314-322.

El mismo trabajo de Paul R. Gory (2007) enseña que las posiciones en V3 por él estudiadas: 308, 317 y 321 no son ni suficientes, ni indispensables, por lo que se propone que trabajan en conjunto para enlazar efectivamente a ECL2. En acuerdo con este trabajo C6R14 es la única respuesta donde interactúan en pleno las regiones mencionadas y que a pesar de que la posición física de V3 no sea

probablemente la mejor respecto a ECL2, esta interacción es la más cercana a una interacción real donde participarían todas las partes aquí mencionadas, y que además posee una energía intermolecular muy aceptable (-3.04 Kcal/mol).

9.3 Mecanismos de interacción y de reacción del segmento variable V3 de gp120 con el correceptor CCR5

Los resultados obtenidos concuerdan con los desarrollados por el grupo de Liu S.Q. En 2003, en este trabajo se describe cómo el acercamiento del complejo CD4-gp120 a CCR5 se da por el extremo N-terminal de CCR5 el cual se encuentra extendido hacia el espacio exterior de la membrana celular, por lo cual la serie de aminoácidos que entran en contacto en primera instancia serían SER6 y SER7 - VAL120 LYS121 LEU122 de gp120 (190).

Esta interacción debe permitir el acercamiento de la ARG440 de gp120 en la hoja de enalce, hacia TYS14 de la región N-terminal de CCR5 en una desprotonación del oxígeno del grupo sulfato que resulta en una resonancia sumamente estable para el grupo sulfotirosilo, de la misma manera que para la arginina, estableciendo un enlace salino. El efecto de esta interacción TYS-ARG debe desencadenar un efecto domino que reorienta a un plegamiento de toda la sección N-terminal en CCR5, obligándola a unirse cuando menos en las regiones 1-15 del correceptor CCR5 a la región V1/V2 de gp120 liberando energía de enlace por las interacciones de Van der Waals generadas y por la formación de puentes de hidrógeno. Este debe ser el momento crucial para el enlace en V3, puesto que mientras que la región N-terminal se encuentra en plegamiento, V3 de gp120 se está acercando hacia el segundo segmento extracelular orientándose por el

campo electrostático generado en gran medida por la ARG315 que se encuentra precisamente en la cresta de V3 que junto con PRO313 que son aminoácidos potencialmente atractivos a algunos en CCR5 como LEU174. Una vez que el acercamiento entre estos grupos cargados se da, ECL2 se debe reorientar en busca de un enlace estable por medio de semi reacciones reversibles entre los aminoácidos de ambas regiones hasta alcanzar un punto de equilibrio cambiando la conformación de los ángulos dihedrales en los aminoácidos de la región 169-173 de ECL2 con la finalidad de estabilizar el sistema.

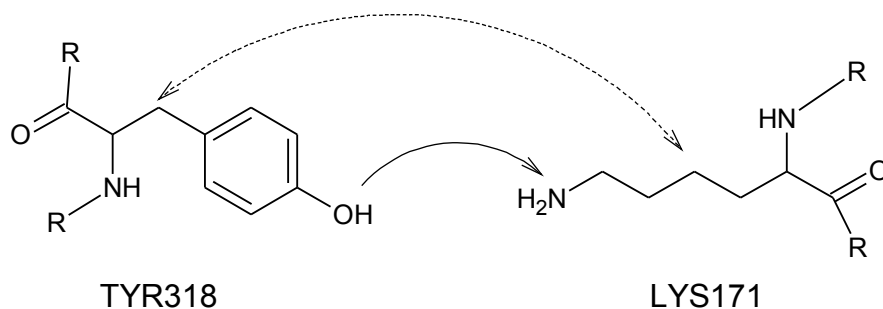
9.3.1 Mecanismos de Reacción

Para las mejores soluciones encontradas que son: C8R1, C6R14 y las interacciones descritas en C4R4, se presenta a continuación un detalle de los mecanismos de reacción para determinar la estabilidad de los productos formados, puesto que como se ha mencionado Autodock posee limitantes en la libertad de rotación de enlace.

9.3.1.1 Análisis de C4R4

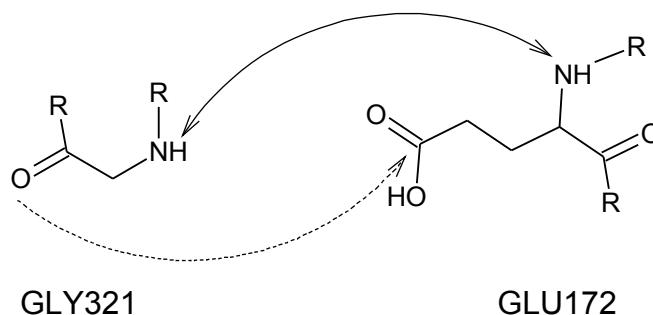
C4R4 provee información importante para observar cuáles interacciones entre V3 y ECL2 de CCR5 son las responsables del aumento de la estabilidad por liberación de energía de enlace entre estas secciones protéicas, por lo cual, se detallan a continuación los mecanismos de reacción entre los enlaces sugeridos por el programa Autodock.

La Gráfica No. 16 E muestra que existen interacciones entre TYR318 y LYS171 las cuales son producto de las fuerzas Van der Waals generadas por inducción dipolo-dipolo inducido entre la amina de cadena lateral presente en LYS171 y el carbono de cadena lateral de TYR318, según lo propone el mismo programa Autodock, que además sugiere interacciones entre el grupo hidroxilo de esta tirosina y y la cadena carbonada de la lisina, sin embargo sería más favorable para la estabilidad del enlace si las interacciones se dieran entre las cadenas carbonadas y entre los grupos polares de ambos aminoácidos como se sugiere a continuación:

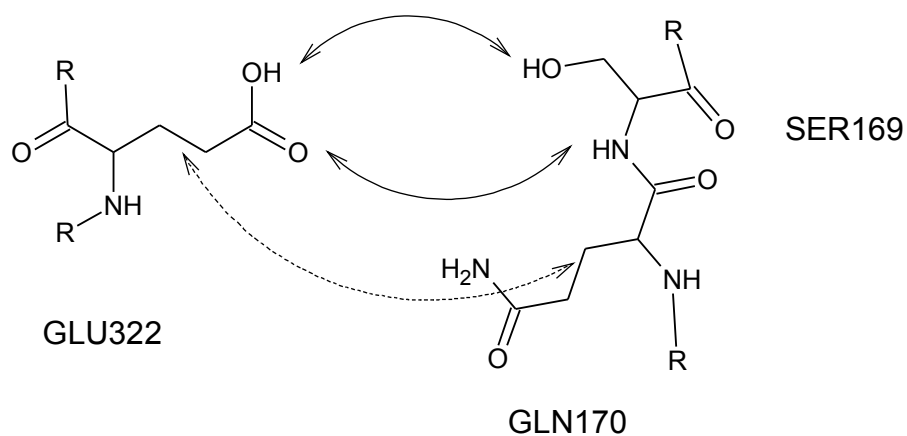


esta incoherencia sugerida por el programa es producto de la rigidez de las cadenas, que es la condición asignada durante la Corrida 4.

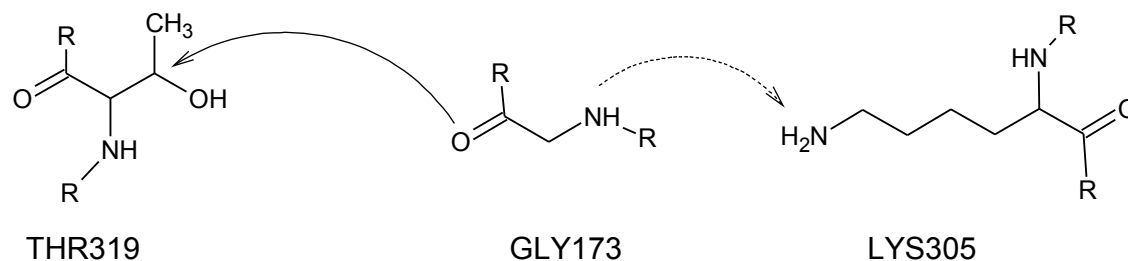
Además en C4R4 se puede observar que GLY321 interactúa con GLU172 formando un puente de hidrógeno señalado en la Gráfica No.16 E como puntos verdes. Estos aminoácidos también interactúan en el oxígeno carboxílico de GLY321 y el carbono alfa y el hidrógeno ácido del mismo GLU172



interacción que se considera sumamente estable. También se observan choques de orbitales moleculares entre GLU322 y la secuencia SER169-GLN170 los cuales son descritos como una atracción dipolo-dipolo entre los grupos R laterales de GLU322 y SER169, además de probables fuerzas de atracción de London presentes entre GLU322 y GLN170.

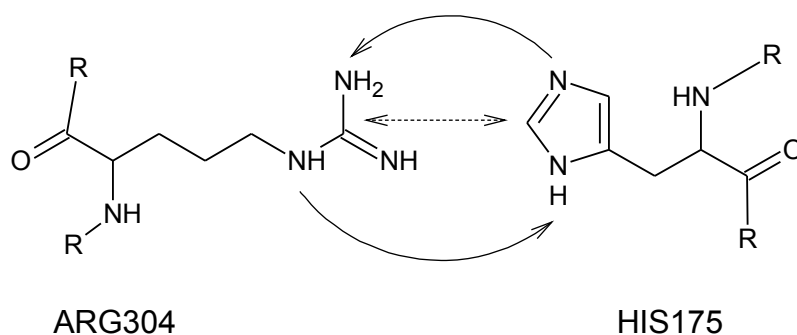


Por otra parte se debe señalar la doble interacción que posee la GLY173, tanto con el carbono electropositivo presente en THR319 como con la interacción con la amina de cadena lateral de LYS305.

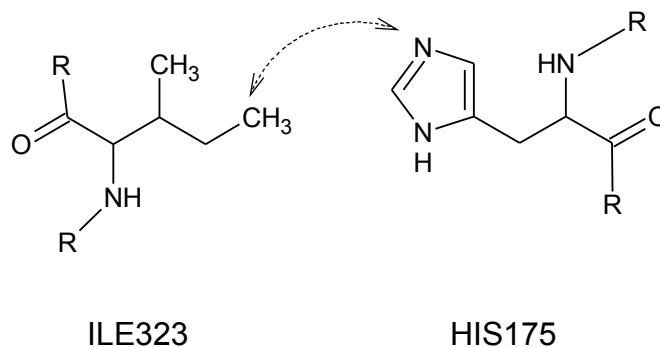


9.3.1.2 Análisis de C6R14

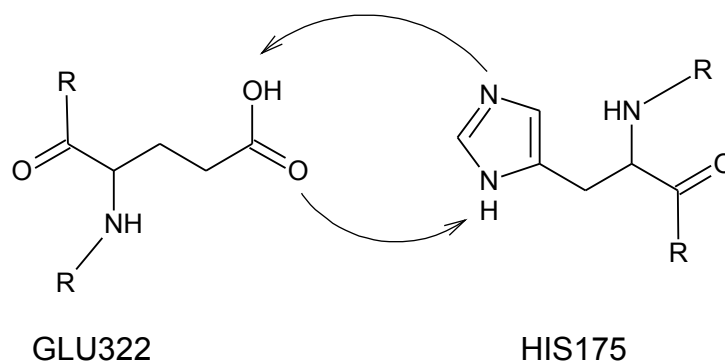
En esta interacción se observa que los grupos amino de ARG304 tienen una fuerte atracción con los nitrógenos presentes en HIS175 puesto que los protones de ambos generan las cargas parciales positivas que atraen a los pares electrónicos libres de los nitrógenos, en la Gráfica No. 18 F se observa cómo los orbitales moleculares de estos grupos se acercan, lo que hace probable un intermediario de resonancia entre estos aminoácidos. Además la flecha punteada recta que se observa entre ARG304 e HIS175 representa las fuerzas de London existentes entre la cadena R de ARG304 y el anillo aromático de HIS175.



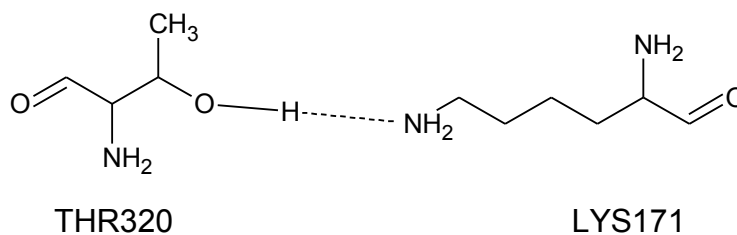
Además también ocurren atracciones por fuerzas de London entre ILE323 e HIS175



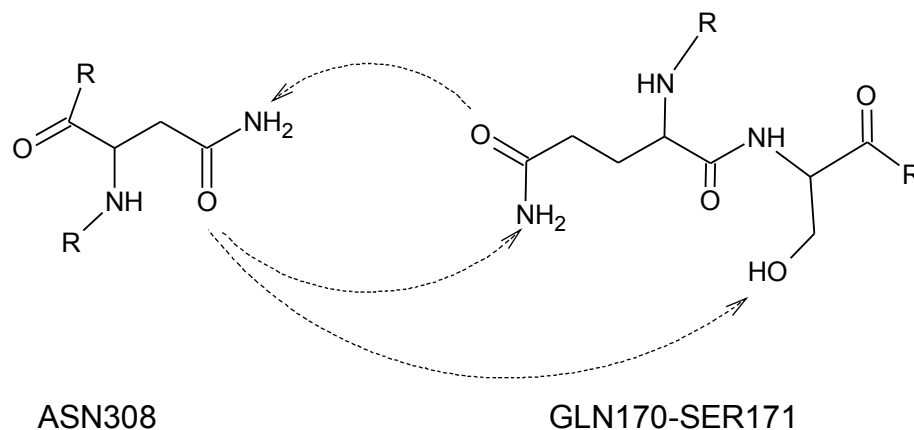
Se propone también que dada la cercanía espacial presente entre GLU322 e HIS175 se puedan formar intermediarios estabilizados por resonancia entre estos aminoácidos.



También debe observarse la existencia de un puente de hidrógeno entre THR320 y LYS171 que se puede observar en la Gráfica No.18 F.

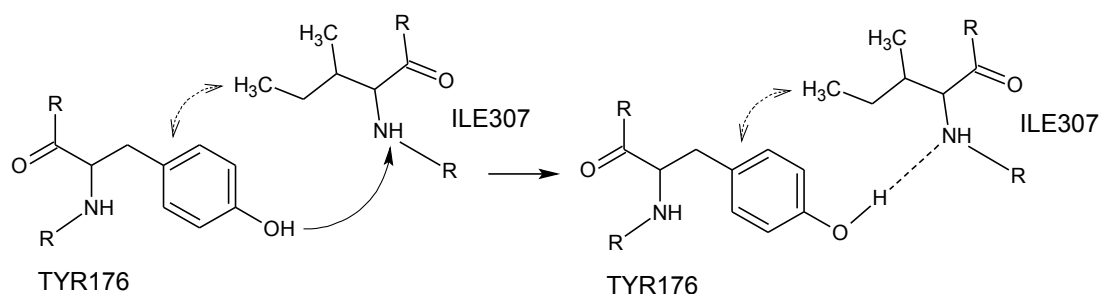


ASN308 posee además una clara interacción con GLN170 puesto que ambos grupos amida deben interactuar formando intermediarios cargados que favorecen la estabilidad de esta unión, además SER171 participa por medio de un hidrógeno hidroxílico presente en su grupo R, el cual se acerca al grupo carbonilo.

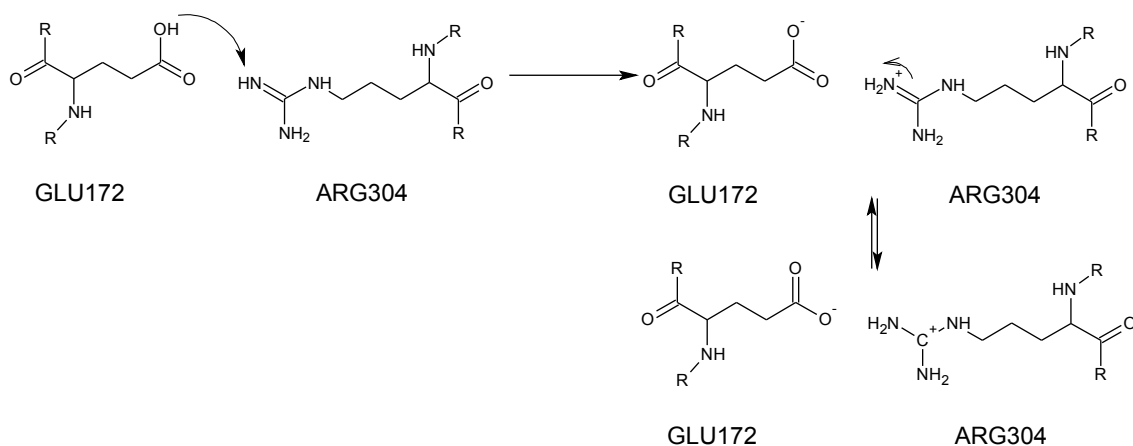


9.3.1.3 Análisis de C8R1

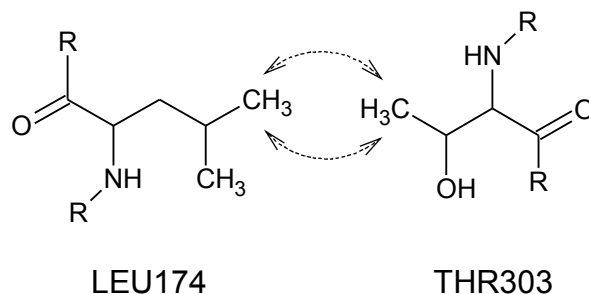
En la Gráfica No.20 D- se aprecian las interacciones en C8R1. TYR176 posee un anillo aromático que atrae el grupo apolar de ILE307, mientras que el hidroxilo de TYR176 se ve fuertemente atraído por el grupo amino de la misma ILE307.



La serina que se encuentra en posición 179 también contribuye con la estabilidad de LYS305 por medio de un acercamiento de los orbitales electrónicos del oxígeno carboxílico en LYS305, hacia el hidrógeno hidroxílico en la serina 179



Otra atracción importante es la generada entre LEU174 y THR303 que dada la gran cercanía que presentan estos aminoácidos, deben interactuar mediante fuerzas de London.



* * *

En general se puede observar que los mecanismos de reacción propuestos justifican la estabilidad de las reacciones de V3 en gp120 con el segmento ECL2 de CCR5. Es razonable proponer entonces que si es posible conseguir una estabilidad en la interacción del segmento ECL2 con las tres diferentes regiones de V3 mencionadas anteriormente, lo cual implica que V3 es muy versátil en su enlace al segmento ECL2, lo cual facilita grandemente la infección de los linfocitos T_h CD4+.

10. Conclusiones

10.1 La región en la que interacciona el segmento CCR5 N-terminal en los aminoácidos 7-15 es la región V1V2 en las posiciones 199-208 principalmente, resultando de suma importancia para la orientación de la reacción la ARG440 presente en la hoja de enlace.

10.2 La región V3 de gp120 de VIH-1 interacciona con el segundo segmento extracelular del correceptor CCR5.

10.3 Las posiciones aminoacídicas en el segmento V3 de gp120 que reaccionan con el segmento ECL2 son:

- a- las posiciones 300-305,
- b- las posiciones 307-308,
- c- las posiciones 314-322.

10.4 Existen en V3 de gp120 aminoácidos que son importantes para el enlace a ECL2, pero su importancia está directamente relacionada a la regla 11/25 que define el tipo de correceptor con el que reaccionará gp120.

10.5 Determinada posición aminoacídica en V3 de gp120 puede ser importante para la disminución de la energía de enlace al reaccionar con ECL2, pero no

existen aminoácidos únicos indispensables para la formación del complejo V3-ECL2.

10.6 Utilizando programas de enlace automatizado se ha logrado elaborar un esquema estructural desarrollado del intermediario en la formación del complejo CCR5-gp120-CD4.

10.7 Los mecanismos de reacción propuestos para las soluciones C6R14 y C8R1 en ayuda con la información obtenida de C4R4, explican el producto de estabilidad de estas uniones V3-ECL2 propuestas, y son el fundamento para explicar el producto de la estabilidad del complejo CCR5-gp120-CD4.

10.8 Los datos experimentales obtenidos con el programa Autodock están de acuerdo con las propuestas existentes sobre los epítomos de reacción entre gp120 y el correceptor CCR5.

11. Recomendaciones

11.1 Se recomienda realizar estudios de mutación aminoacídica sobre los segmentos de ECL2 para determinar el comportamiento del segmento variable 3 en gp120 de VIH-1.

11.2 Es posible continuar con el estudio de sustancias activas que inhiban la interacción gp120-CD4 en base a los sitios de reacción y los mecanismos de reacción propuestos con esta investigación.

11.3 Las sustancias activas también pueden ser predichas utilizando programas computacionales de desarrollo de principios activos, como por ejemplo SYBYL 8.0 de Trypos.

11.4 Actualmente el desarrollo de medicamentos en contra del trímero gp160 de VIH y de los correceptores, ha perdido fuerza debido a que estos medicamentos no estimulan una respuesta inmune adecuada. Es conveniente desarrollar nuevas investigaciones sobre los mecanismos de acción de otros elementos presentes en VIH orientados a prevenir o curar la enfermedad.

11.5 Los resultados obtenidos se pueden extender en un programa de investigación que valide el papel de los programas computacionales con los datos experimentales para validar los límites y la certeza de los mismos.

En el transcurso de esta investigación se observó que los programas computacionales de predicción de enlace receptor - ligando, pertenecen al desarrollo científico - tecnológico que está cobrando fuerza, y tiene grandes ventajas en el ahorro de tiempo y materiales de investigación, por lo que se recomienda incorporarlo con urgencia en los programas educativos y en la investigación científica para poder desarrollar una ventaja competitiva en los profesionales egresados del país.

12. Referencias

Historia del descubrimiento de VIH

- 1- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, *et al.* **Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for AIDS.** Science 1983, 220: 868-71.
<http://amedeo.com/lit.php?id=6189183>
- 2- Cherman J.C. *et al.*, **Isolation of a new retrovirus in a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome.** *Antibiot Chemother.* 1983.82: P. 48-53.
- 3- Broder S, Gallo RC. **A pathogenic retrovirus (HTLV-III) linked to AIDS.** *N Engl J Med* 1984, 311:1292-7.
- 4- Centers for Disease Control (1981a). **Pneumocystis pneumonia--Los Angeles.** *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1981, 30: 250-2. Volltext: <http://hiv.net/link.php?id=144>
- 5- Centers for Disease Control (1981c). **Follow-up on Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia.** *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1981, 30: 409-10.
- 6- Centers for Disease Control (1981b). **Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexualmen--New York City and California.** *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1981, 30: 305-8.

7- Centers for Disease Control (1982a). **Epidemiologic notes and reports persistent, generalized lymphadenopathy among homosexual males.** MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1982, 31: 249. <http://hiv.net/link.php?id=145>

8- Centers for Disease Control (1982b). **Epidemiologic notes and reports update on kaposi's sarcoma and opportunistic infections in previously healthy persons** -- United States. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1982, 31: 294. <http://hiv.net/link.php?id=146>

9- Centers for Disease Control (1982c). **A Cluster of Kaposi's Sarcoma and Pneumocystis carinii Pneumonia among Homosexual Male Residents of Los Angeles and range Counties, California.** MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1982, 31: 305. <http://hiv.net/link.php?id=147>

10- Centers for Disease Control (1982d). **Opportunistic Infections and Kaposi's Sarcoma among Haitians in the United States.** MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1982, 31: 353. <http://hiv.net/link.php?id=148>

11- Centers for Disease Control (1982e). **Epidemiologic Notes and Reports Pneumocystis carinii Pneumonia among Persons with Hemophilia A.** MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1982, 31: 365. <http://hiv.net/link.php?id=149>

12- Centers for Disease Control (1982f). **Update on Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) among Patients with Hemophilia A.** MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1982, 31: 644.

13- Alarcón Segovia, Donato y Samuel Ponce de León Rosales (eds.) El SIDA en México 20 años de la epidemia. **Primeras descripciones e investigaciones sobre el SIDA en México (Introducción).** México: El Colegio Nacional, 2003, p 13-7 bvssida.insp.mx/articulos/4287.pdf

14-Centers for Disease Control (1982g). **Epidemiologic Notes and Reports Possible Transfusion- Associated Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS)** . California. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1982, 31, 652.

<http://hiv.net/link.php?id=150>

15-Centers for Disease Control (1982h). **Unexplained Immunodeficiency and Opportunistic Infections in Infants -- New York, New Jersey, California.**

MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1982, 31: 665. <http://hiv.net/link.php?id=152>

16- Centers for Disease Control (1982i). **Epidemiologic Notes and Reports Immunodeficiency among Female Sexual Partners of Males with Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) -- New York.** MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1982, 31, 697.

<http://hiv.net/link.php?id=154>

17- Centers for Disease Control (1982j). **Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) in Prison Inmates -- New York, New Jersey.** MMWR Morb

Mortal Wkly Rep 1982, 31: 700. <http://hiv.net/link.php?id=153>

18- Dilys Morgan, Samuel S. Malamba, Gillian H. Maude, Martin J. Okongo, Hans-Ulrich Wagner, Daan W. Mulder and James A. Whitworth. **An HIV-1 natural history cohort and survival times in rural Uganda.** AIDS 1997, 11:633–640

19- De Cock. K.M. *et al.*, **Epidemiology and transmisión of HIV-2. Why there is no HIV-2 pandemic.** Jama. 1993. 270, 17:p.2083-6

20- Popper, S.J., *et al.*, **Lower Human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2.** J Infect Dis, 1999. 180 (4): p. 1116-21.

21- Gao. F., *et al.*, **Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa.** Nature. 1992. (358) 6386: p 495-9

22- Hirsch, V.M., *et al.* **An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2.** Nature, 1989. 339 (6223): p. 389-92.

23- Gao, F., *et al.*, **Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*** Nature, 1999. 397 (6718): p. 436-41.

24- Anushka Llano Montero. **Tesis Doctoral: Factores del huésped que afectan a la progresión de la infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana de tipo 1 (VIH-1).** Universidad Autónoma de Barcelona. Diciembre 2004. p 1-31

25- Catalina Martínez Ibarra. **Tesis Doctoral: Factores Inmunitarios Protectivos del Huésped Contra la Infección Por El VIH-1 Y La Progresión a SIDA: Quimiocinas Y Sus Receptores.** Barcelona, Noviembre de 2001. p: 1- 117

26- Elias B. Pezzat Said. Tesis doctoral: **Desarrollo de una vacuna preventiva contra el VIH, basada en BCG recombinante.** Universidad de Barcelona, Facultad de Medicina, España, 21 de Junio de 2005. p: 1-120.

27- Tristram G. Parslow, Daniel P. Stites, Abba I. Terr, John B. Imboden. **Inmunología básica y clínica.** 10ª. Edición. Editorial Manual Moderno. México 2002. p: 149-167, 751-773.

Epidemiología

28- Africa Holguín. **Clasificación Del Virus De La Inmunodeficiencia Humana. Hospital Carlos III.** Sistema Nacional de Salud. España 2005. P:1-5.
www.aamic.es/areas-tematicas/documentos/TEMA_AAMIC_310805_01.pdf

29- ONUSIDA – OMS. **Situación de la epidemia de SIDA 2007**. Versión española. España diciembre de 2007.

30- Cesar Galindo. **Informe Nacional sobre los progresos realizados en el seguimiento a la declaración de compromiso sobre el VIH y SIDA – UNGASS Guatemala 2007**. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Programa Nacional de Prevención y Control de ITS, VIH y SIDA. Guatemala 2007.

31-Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social Centro Nacional de Epidemiología Programa Nacional de Prevención y Control de ITS, VIH y SIDA. **Informe de notificación casos SIDA Enero1984 – Octubre 2007**. Guatemala 2007

32- Judith García Epidemióloga, FETP-GAP. **Situación de la epidemia de VIH-SIDA, Guatemala Enero 1984 - Octubre 2007** Centro Nacional de Epidemiología Guatemala, octubre 2007.

Conceptos Fundamentales sobre Inmunología

33- Chen X, Jensen PE. **The role of B lymphocytes as antigen-presenting cells.**

Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2008 Mar 31

34- Hon H, Oran A, Brocker T, Jacob J. **B lymphocytes participate in cross-presentation of antigen following gene gun vaccination.** J Immunol. 2005 May 1;174(9):5233-42.

35- Casten LA, Pierce SK. **Receptor-mediated B cell antigen processing. Increased antigenicity of a globular protein covalently coupled to antibodies specific for B cell surface structures.** J Immunol. 1988 Jan 15;140(2):404-10.

- 36- Malynn BA, Romeo DT, Wortis HH. **Antigen-specific B cells efficiently present low doses of antigen for induction of T cell proliferation.** J Immunol. 1985 Aug;135(2):980-8.
- 37- J Cell Sci. 2000 Oct;113 (Pt 20):3549-50. **Unravelling the net ? cytokines and diseases.** Townsend MJ, McKenzie AN.
- 38- T.E. Lane. **Chemokines and viral infection.** Editorial Spring. California. USA. 2006. P:1 -47.
- 39- Fernandez EJ, Lolis E. **Structure, function, and inhibition of chemokines.** Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2002;42:469-99. Review.
- 40- Le Y, Gong W, Shen W, Li B, Dunlop NM, Wang JM. **A burgeoning family of biological mediators: chemokines and chemokine receptors.** Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2000;48(3):143-50. Review.
- 41- Oliveira SH, Lukacs NW. **The role of chemokines and chemokine receptors in eosinophil activation during inflammatory allergic reactions.** Braz J Med Biol Res. 2003 Nov;36(11):1455-63. Epub 2003 Oct 22. Review.
- 42- Colobran R, Pujol-Borrell R, Armengol MP, Juan M. **The chemokine network. I. How the genomic organization of chemokines contains clues for deciphering their functional complexity.** Clin Exp Immunol. 2007 May;148(2):208-17. Review.
- 43- Nomiya H, Mera A, Ohneda O, Miura R, Suda T, Yoshie O. **Organization of the chemokine genes in the human and mouse major clusters of CC and CXC chemokines: diversification between the two species.** Genes Immun. 2001 Apr;2(2):110-3.

- 44- Fukuda S, Hanano Y, Iio M, Miura R, Yoshie O, Nomiya H. **Genomic organization of the genes for human and mouse CC chemokine LEC.** DNA Cell Biol. 1999 Apr;18(4):275-83.
- 45- Maho A, Carter A, Bensimon A, Vassart G, Parmentier M. **Physical mapping of the CC-chemokine gene cluster on the human 17q11.2 region.** Genomics. 1999 Jul 15;59(2):213-23.
- 46- Nomiya H, Fukuda S, Iio M, Tanase S, Miura R, Yoshie O. **Organization of the chemokine gene cluster on human chromosome 17q11.2 containing the genes for CC chemokine MIP1-1, HCC-2, HCC-1, LEC, and RANTES.** J Interferon Cytokine Res. 1999 Mar;19(3):227-34.
- 47- Brady AE, Limbird LE. **G protein-coupled receptor interacting proteins: emerging roles in localization and signal transduction.** Cell Signal. 2002 Apr;14(4):297-309.
- 48- Brady AE, Limbird LE. **G protein-coupled receptor interacting proteins: emerging roles in localization and signal transduction.** Cell Signal. 2002 Apr;14(4):297-309. Review.
- 49- Premack BA, Schall TJ. **Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection.** Nat Med 1996; 2[11], 1174-1178.
- 50- Schall TJ, Bacon KB. **Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation.** Curr Opin Immunol 1994; 6:865-873.
- 51- Springer TA. **Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm.** Cell 1994; 76:301-314.

52- Lesley Jane, Eales. **Immunology for life Scientists**. Second edition, Willey Interscience. United Kingdom 2003 P. 30-34, 72.

53- Alfredo Garzino-Demo, Ronald B. Moss, Joseph B. Margolick, Farley Cleghorn, Anne Sill, William A. Blattner, Fiorenza Cocchi, Dennis J. Carlo, Anthony L. DeVico, and Robert C. Gallo. **Spontaneous and antigen-induced production of HIV-inhibitory b-chemokines are associated with AIDS-free status**. PNAS, October 12, 1999, vol. 96, no. 21. P: 11986–11991

Respuesta Inmune del Cuerpo

54- Levy J.A. **Protection from HIV/AIDS: the important of innate immunity**. Clinical. Immunology 108: 167-74 2003.

55- Masson F, Mount AM, Wilson NS, Belz GT. **Dendritic cells: driving the differentiation programme of T cells in viral infections**. Immunol Cell Biol. 2008 Mar 18.

56- Yoshino H, Takahashi K, Monzen S, Kashiwakura I. **Differential Induction from X-irradiated Human Peripheral Blood Monocytes to Dendritic Cells**. J Radiat Res (Tokyo). 2008 Mar 14.

57- Ochoa MT, Loncaric A, Krutzik SR, Becker TC, Modlin RL. **"Dermal Dendritic Cells" Comprise Two Distinct Populations: CD1(+) Dendritic Cells and CD209(+) Macrophages**. J Invest Dermatol. 2008 Mar 13

58- Sarris M, Andersen KG, Randow F, Mayr L, Betz AG. **Neuropilin-1 Expression on Regulatory T Cells Enhances Their Interactions with Dendritic Cells during Antigen Recognition**. Immunity. 2008 Mar;28(3):402-13.

- 59- Scholer A, Hugues S, Boissonnas A, Fetler L, Amigorena S. **Intercellular adhesion molecule-1-dependent stable interactions between T cells and dendritic cells determine CD8+ T cell memory.** Immunity. 2008 Feb;28(2):258-70.
- 60- Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. **Regulatory T cells and human disease.** Clin Dev Immunol 2007;2007:89195.
- 61- Mahnke K, Bedke T, Enk AH. **Regulatory conversation between antigen presenting cells and regulatory T cells enhance immune suppression.** Cell Immunol. 2008 Feb 28.
- 62- Yamaura A, Hotta C, Nakazawa M, Van Kaer L, Minami M. **Human invariant V{alpha}24+ natural killer T cells acquire regulatory functions by interacting with IL-10-treated dendritic cells.** Blood. 2008 Feb 13
- 63- Delfraissy JF. **[Immunologic and viral mechanisms implicated in HIV infection: the impact of treatment].** Rev Prat. 1999 Oct 15;49(16):1740-5. French.
- 64- Vera-Sempere G, Vera-Sempere FJ, Guix-García J. **[Generalized persistent lymphadenopathy syndrome in parenteral drug addicts. Lymph node biopsy study of 41 patients].** An Med Interna. 1990 Dec;7(12):621-6. Spanish.
- 65- Yang X, Chen Y, Gabuzda D. **ERK MAP kinase links cytokine signals to activation of latent HIV-1 infection by stimulating a cooperative interaction of AP-1 and NF-kappa B.** J Biol Chem. 1999 Sep 24;274(39):27981-8.
- 66- Anju Singh, Marcel Wüthrich, Bruce Klein, and M. Suresh. **Indirect Regulation of CD4 T-Cell Responses by Tumor Necrosis Factor. Receptors in an Acute Viral Infection.** J Virol. 2007 June; 81(12): 6502–6512.

67- Equils O, Schito ML, Karahashi H, Madak Z, Yarali A, Michelsen KS, Sher A, Arditi M. **Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR9 signaling results in HIV-long terminal repeat trans-activation and HIV replication in HIV-1 transgenic mouse spleen cells: implications of simultaneous activation of TLRs on HIV replication.** J Immunol. 2003 May 15;170(10):5159-64.

68- Kitaura H, Ohara N, Kobayashi K, Yamada T. **TNF-alpha-mediated activation of HIV-1 LTR in monocytoid cells by mycobacteria.** FEMS Immunol Med Microbiol. 2001 Aug;31(2):97-103.

69- Nordone SK, Ignacio GA, Su L, Sempowski GD, Golenbock DT, Li L, Dean GA. **Failure of TLR4-driven NF-kappa B activation to stimulate virus replication in models of HIV type 1 activation.** AIDS Res Hum Retroviruses. 2007 Nov;23(11):1387-95.

70- Schroder AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F. **HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots.** Cell. 2002 Aug 23;110(4):521-9.

71- Lampe FC, Porter K, Kaldor J, Law M, Kinloch-de Loes S, Phillips AN; CASCADE Collaboration. **Effect of transient antiretroviral treatment during acute HIV infection: comparison of the Quest trial results with CASCADE natural history study.** Antivir Ther. 2007;12(2):189-93.

72- Tenner-Racz K, Stellbrink HJ, van Lunzen J, Schneider C, Jacobs JP, Raschdorff B, Grosschupff G, Steinman RM, Racz P. **The unenlarged lymph nodes of HIV-1-infected, asymptomatic patients with high CD4 T cell counts are sites for virus replication and CD4 T cell proliferation. The impact of highly active antiretroviral therapy.** J Exp Med. 1998 Mar 16;187(6):949-59.

73- Orenstein JM, Feinberg M, Yoder C, Schragger L, Mican JM, Schwartzentruber DJ, Davey RT Jr, Walker RE, Falloon J, Kovacs JA, Miller KD, Fox C, Metcalf JA, Masur H, Polis MA. **Lymph node architecture preceding and following 6 months of potent antiviral therapy: follicular hyperplasia persists in parallel with p24 antigen restoration after involution and CD4 cell depletion in an AIDS patient.** AIDS. 1999 Nov 12;13(16):2219-29.

74- Hoffmann, Jürgen K. Rockstroh, Bernd Sebastian Kamps **HIV Medicine 2007** 15th Edition. Edited by Christian Flying Publisher. Paris, France, 2007. P: 62 -76 www.HIVMedicine.com

75- Allen TM, Altfeld M, Geer SC, Kalife ET, Moore C, O'sullivan KM, Desouza I, Feeney ME, Eldridge RL, Maier EL, Kaufmann DE, Lahaie MP, Reyor L, Tanzi G, Johnston MN, Brander C, Draenert R, Rockstroh JK, Jessen H, Rosenberg ES, Mallal SA, Walker BD. **Selective escape from CD8+ T-cell responses represents a major driving force of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) sequence diversity and reveals constraints on HIV-1 evolution.** J Virol. 2005 Nov;79(21):13239-49.

76- Draenert R, Allen TM, Liu Y, Wrin T, Chappey C, Verrill CL, Sirera G, Eldridge RL, Lahaie MP, Ruiz L, Clotet B, Petropoulos CJ, Walker BD, Martinez-Picado J. **Constraints on HIV-1 evolution and immunodominance revealed in monozygotic adult twins infected with the same virus.** J Exp Med. 2006 Mar 20;203(3):529-39.

77- Boulet S, Sharafi S, Simic N, Bruneau J, Routy JP, Tsoukas CM, Bernard NF. **Increased proportion of KIR3DS1 homozygotes in HIV-exposed uninfected individuals.** AIDS. 2008 Mar 12;22(5):595-9.

78- Foley B, De Santis D, Lathbury L, Christiansen F, Witt C. **KIR2DS1-mediated activation overrides NKG2A-mediated inhibition in HLA-C C2-negative individuals.** *Int Immunol.* 2008 Apr;20(4):555-63.

79- Kalams SA, Buchbinder SP, Rosenberg ES, Billingsley JM, Colbert DS. **Association between virus-specific cytotoxic T-lymphocyte and helper responses in human immunodeficiency virus type 1 infection.** *J Virol.* 1999 Aug; 73(8):6715-20.

80- Schneidewind A, Brockman MA, Yang R, Adam RI, Li B, Le Gall S, Rinaldo CR, Craggs SL, Allgaier RL, Power KA, Kuntzen T, Tung CS, LaBute MX, Mueller SM, Harrer T, McMichael AJ, Goulder PJ, Aiken C, Brander C, Kelleher AD, Allen TM. **Escape from the dominant HLA-B27-restricted cytotoxic T-lymphocyte response in Gag is associated with a dramatic reduction in human immunodeficiency virus type 1 replication.** *J Virol.* 2007 Nov;81(22):12382-93.

81- Hay CM, Ruhl DJ, Basgoz NO, Wilson CC, Billingsley JM, DePasquale MP, D'Aquila RT, Wolinsky SM, Crawford JM, Montefiori DC, Walker BD. **Lack of viral escape and defective in vivo activation of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes in rapidly progressive infection.** *J Virol.* 1999 Jul;73(7):5509-19.

82- Goulder PJ, Phillips RE, Colbert RA, *et al.* **Late escape from an immunodominant cytotoxic T lymphocyte response associated with progression to AIDS.** *Nat Med* 1997, 3: 212-7. <http://amedeo.com/lit.php?id=9018241>

83- Garcia E, Nikolic DS, Piguet V. **HIV-1 replication in dendritic cells occurs through a tetraspanin-containing compartment enriched in AP-3.** *Traffic.* 2008 Feb;9(2):200-14.

84- Sirois M, Robitaille L, Sasik R, Estaquier J, Fortin J, Corbeil J.

R5 and X4 HIV Viruses Differentially Modulate Host Gene Expression in Resting CD4(+) T Cells. AIDS Res Hum Retroviruses. 2008 Mar;24(3):485-93

85- Huang W, Eshleman SH, Toma J, Fransen S, Stawiski E, Paxinos EE, Whitcomb JM, Young AM, Donnell D, Mmiro F, Musoke P, Guay LA, Jackson JB, Parkin NT, Petropoulos CJ. **Coreceptor tropism in human immunodeficiency virus type 1 subtype D: high prevalence of CXCR4 tropism and heterogeneous composition of viral populations.** J Virol. 2007 Aug;81(15):7885-93.

86- Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, *et al.* **Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+T cells leads to reversible immune dysfunction.** Nat Med 2006; 12: 1198-202. <http://amedeo.com/lit.php?id=16917489>

87- Ha SJ, Mueller SN, Wherry EJ, Barber DL, Aubert RD, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R. **Enhancing therapeutic vaccination by blocking PD-1-mediated inhibitory signals during chronic infection.** J Exp Med. 2008 Mar 17; 205(3):543-55.

88- Ueno T, Motozono C, Dohki S, Mwimanzi P, Rauch S, Fackler OT, Oka S, Takiguchi M. **CTL-mediated selective pressure influences dynamic evolution and pathogenic functions of HIV-1 Nef.** J Immunol. 2008 Jan 15;180(2):1107-16.

89- Navis M, Schellens IM, Swieten PV, Borghans JA, Miedema F, Kootstra NA, van Baarle D, Schuitemaker H. **A Nonprogressive Clinical Course in HIV-Infected Individuals Expressing Human Leukocyte Antigen B57/5801 Is Associated with Preserved CD8(+) T Lymphocyte Responsiveness to the HW9 Epitope in Nef.** J Infect Dis. 2008 Feb 15

- 90- Saha K, Zhang J, Gupta A, Dave R, Yimen M, Zerhouni B. **Isolation of primary HIV-1 that target CD8+ T lymphocytes using CD8 as a receptor.** Nat Med. 2001 Jan;7(1):65-72. Erratum in: Nat Med 2001 Feb;7(2):255.
- 91- Saha K, Zhang J, Zerhouni B. **Evidence of productively in infected CD8+ T cells in patients with AIDS: implications for HIV-1 pathogenesis.** J Acquir Immune Defic Syndr. 2001 Mar 1; 26(3):199-207.
- 92- Lanier LL. **Evolutionary struggles between NK cells and viruses.** Nat Rev Immunol. 2008 Apr;8(4):259-68.
- 93- Wong MT, Warren RQ, Anderson SA, Dolan MJ, Hendrix CW, Blatt SP, Melcher GP, Boswell RN, Kennedy RC. **Longitudinal analysis of the humoral immune response to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp160 epitopes in rapidly progressing and nonprogressing HIV-1-infected subjects.** J Infect Dis. 1993 Dec;168(6):1523-7.
- 94- Bolmstedt A, Sjolander S, Hansen JE, Akerblom L, Hemming A, Hu SL, Morein B., Olofsson S. **Influence of N-linked glycans in V4-V5 region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp160 on induction of a virus-neutralizing humoral response.** J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1996 Jul;12(3):213-20.
- 95- Rowland-Jones S, Sutton J, Ariyoshi K, Dong T, Gotch F, McAdam S, Whitby D, Sabally S, Gallimore A, Corrah T, *et al.* **HIV-specific cytotoxic T-cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women.** Nat Med. 1995 Jan;1(1):59-64. Erratum in: Nat Med 1995 Jun;1(6):598.
- 96- Kimani J, Kaul R, Nagelkerke NJ, Luo M, MacDonald KS, Ngugi E, Fowke KR, Ball BT, Kariri A, Ndinya-Achola J, Plummer FA. **Reduced rates of HIV**

acquisition during unprotected sex by Kenyan female sex workers predated population declines in HIV prevalence. AIDS. 2008 Jan 2;22(1):131-7.

97- Alimonti JB, Kimani J, Matu L, Wachihi C, Kaul R, Plummer FA, Fowke KR. **Characterization of CD8 T-cell responses in HIV-1-exposed seronegative commercial sex workers from Nairobi, Kenya.** Immunol Cell Biol. 2006 Oct;84(5):482-5.

98- Westby M, Manca F, Dalgleish AG. **The role of host immune responses in determining the outcome of HIV infection.** Immunol Today 1996; 17:120-126.

99- Ip WK, Takahashi K, Moore KJ, Stuart LM, Ezekowitz RA. **Mannose-binding lectin enhances Toll-like receptors 2 and 6 signaling from the phagosome.** J Exp Med. 2008 Jan 21;205(1):169-81.

100- Resino S, Bellón JM, Jiménez JL, Gurbindo MD, Muñoz-Fernández MA. **[Role of cytokines and chemokines in the non-progression of HIV infection in vertically infected children]** Med Clin (Barc). 2000 May 6;114(17):641-6

101- Hirbod T, Reichard C, Hasselrot K, Söderlund J, Kimani J, Bwayo JJ, Plummer F, Kaul R, Broliden K. **HIV-1 neutralizing activity is correlated with increased levels of chemokines in saliva of HIV-1-exposed uninfected individuals.** Curr HIV Res. 2008 Jan;6(1):28-33.

102- B. E. Palmer, E. Boritz, N. Blyveis, and C. C. Wilson. **Discordance between Frequency of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Specific Gamma Interferon-Producing CD4⁺ T Cells and HIV-1-Specific Lymphoproliferation in HIV-1-Infected Subjects with Active Viral Replication.** J. Virol. 2002 76: 5925-5936.

- 103- Cousens LP *et al.* **Two roads diverged: Interferon alfa/beta – and interleukin 12-mediated pathways in promoting T-cell interferon gamma responses during viral infection.** J Exp Med 1999; 189: 1315.
- 104- Marrack P *et al.* **Type I inte4rferons keep activated T cells alive.** J Exp Med 1999; 189:521.
- 105- Pillai SK, Wong JK, Barbour JD. **Turning up the volume on mutational pressure: is more of a good thing always better? (a case study of HIV-1 Vif and APOBEC3).** Retrovirology. 2008 Mar 13;5(1):26
- 106- Barraud P, Paillart JC, Marquet R, Tisné C. **Advances in the structural understanding of Vif proteins.** Curr HIV Res. 2008 Mar;6(2):91-9.
- 107- Muenk C, Beck T, Zielonka J, Hotz-Wagenblatt A, Chareza S, Battenberg M, Thielebein J, Cichutek K, Bravo IG, O'Brien S, Loechelt M, Yuhki N. **Functions, structure, and read-through alternative splicing of feline APOBEC3 genes.** Genome Biol. 2008 Mar 3;9(3):R48
- 108- Dang Y, Siew LM, Wang X, Han Y, Lampen R, Zheng YH. **Human cytidine deaminase APOBEC3H restricts HIV-1 replication.** J Biol Chem. 2008 Apr 25;283(17):11606-14
- 109- Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C. **Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS.** Science 1986; 233:343-346.
- 110- Lewis P, Hensel M, Emerman M. **Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle.** EMBO J 1992; 11:3053-3058.

- 111- Lewis PF, Emerman M. **Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus.** *J Virol* 1994; 68:510-516.
- 112- John B. Carter and Venetia A. Saunders. **Virology, Principles and Applications.** Editorial Jonh Willey and Sons. Liverpool United Kindom 2007. p 199.
- 113- Ozel M, Pauli G, Gelderblom HR :. **The organization of the envelope projections on the surface of HIV** *Arch Virol* 1988, 100:255-266.
- 114- Joshua M Costin, Joshua M Rausch, Robert F Garry **and** William C Wimley **Viroporin potential of the lentivirus lytic peptide (LLP) domains of the HIV-1 gp41 protein.** *Virology Journal* 2007, 4:12.
- 115- Takahashi I, Takama M, Ladhoff AM, Scholz D. **Envelope structure model of human immunodeficiency virus type 1.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 1989, 2:136-140.
- 116- Gallo, R., *et al.*, **HIV/HTLV gene nomenclature [letter].** *Nature*, 1988 333 7163 p.504
- 117- Lesley C. Dupuy, Nathan J. Kelly, Tricia E. Elgavish, Stephen C. Harvey, and Casey D. Morrow. **Probing the Importance of tRNA Anticodon: Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) RNA Genome Complementarity with an HIV-1 That Selects tRNA^{Glu} for Replication** *J. Virol.* 2003 77: 8756-8764.
- 118- Mario R. Mautino, Nicholas Keiser, and Richard A. Morgan. **Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Replication by HIV-1-Based Lentivirus Vectors Expressing Transdominant Rev** *J. Virol.* 2001 75: 3590-3599.

119- R Sanchez-Pescador, MD Power, PJ Barr, KS Steimer, MM Stempien, SL Brown-Shimer, WW Gee, A Renard, A Randolph, JA Levy, and *al. et.* **Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus (ARV-2)** Science, Vol 227, Issue 4686, 484-492

120- Paul Jay Maddon, Dan R. Littman, Maurice Godfrey, Douglas E. Maddon, Leonard Chess and Richard Axel **The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: a new member of the immunoglobulin gene family.** Cell Volume 42, Issue 1, August 1985, p. 93-104

121- C A Jordan, B A Watkins, C Kufita, and M Dubois-Dalc. **Infection of brain microglial cells by human immunodeficiency virus type 1 is CD4 dependent.** J. Virol. 1991 65: 736-742.

122- Deng HK, Unutmaz D, Kewalramani VN, Littman DR. **Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses.** Nature 1997, 388: 296-300. <http://amedeo.com/lit.php?id=9230441>

123- Liao F, Alkhatib G, Peden KWC, Sharma G, Berger EA, Farber JM. **STRL-33, A novel chemokine receptor-like protein, functions as a fusion cofactor for both macrophage-tropic and T cell line-tropic HIV-1.** J Exp Med 1997, 185: 2015-23. <http://amedeo.com/lit.php?id=9166430>

124- Doranz, B. J., *et al.*, **A dual – tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors.** Cell, 1996. 85(7): p. 1149-58.

125- Horuk, R., *et al.*, **The CC chemokine I-309 inhibits CCR8-dependent infection by diverse HIV strains.** J Biol Chem, 1998. 273(1): p.386-91.

126- Zabel, B.A., *et al.*, **Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine mediated chemotaxis.** J Exp Med, 1999. 190(9): p. 1241-56.

127- Saha, K., *et al.*, **Isolation of primary HIV-1 that target CD8+ T lymphocytes using CD8 as a receptor.** Nat Med, 2001. 7(1): p. 65- 72.

128- Jochmans D. **Novel HIV-1 reverse transcriptase inhibitors.** Virus Res. 2008 Feb 26.

129- Basu VP, Song M, Gao L, Rigby ST, Hanson MN, Bambara RA. **Strand transfer events during HIV-1 reverse transcription.** Virus Res. 2008 Jun;134(1-2):19-38

130- Poon B, Chang MA, Chen IS. **Vpr is required for efficient Nef expression from unintegrated human immunodeficiency virus type 1 DNA.** J Virol. 2007 Oct;81(19):10515-23.

131- Herschhorn A, Oz-Gleenberg I, Hizi A. **Quantitative analysis of the interactions between HIV-1 integrase and retroviral reverse transcriptases.** Biochem J. 2008 May 15;412(1):163-70.

132- Collins KL, Chen BK, Kalams SA, Walker BD, Baltimore D. **HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes.** Nature. 1998 Jan 22;391(6665):397-401.

133- Lewis MJ, Balamurugan A, Ohno A, Kilpatrick S, Ng HL, Yang OO. **Functional Adaptation of Nef to the Immune Milieu of HIV-1 Infection In Vivo.** J Immunol. 2008 Mar 15;180(6):4075-81.

134- Atkins KM, Thomas L, Youker RT, Harriff MJ, Pissani F, You H, Thomas G. **HIV-1 NEF binds PACS-2 to assemble a multi-kinase cascade that triggers MHC-I downregulation: Analysis using siRNA and knockout mice.** J Biol Chem. 2008 Apr 25;283(17):11772-84.

135- Dowling D, Nasr-Esfahani S, Tan CH, O'Brien K, Howard JL, Jans DA, Purcell DF, Stoltzfus CM, Sonza S. **HIV-1 infection induces changes in expression of cellular splicing factors that regulate alternative viral splicing and virus production in macrophages.** Retrovirology. 2008 Feb 4;5(1):18

136- Edgcomb SP, Aschrafi A, Kompfner E, Williamson JR, Gerace L, Hennig M. **Protein structure and oligomerization are important for the formation of export-competent HIV-1 Rev-RRE complexes.** Protein Sci. 2008 Mar;17(3):420-30.

137- Dowling D, Nasr-Esfahani S, Tan CH, O'Brien K, Howard JL, Jans DA, Purcell DF, Stoltzfus CM, Sonza S. **HIV-1 infection induces changes in expression of cellular splicing factors that regulate alternative viral splicing and virus production in macrophages.** Retrovirology. 2008 Feb 4;5(1):18

138- Hayouka Z, Rosenbluh J, Levin A, Maes M, Loyter A, Friedler A. **Peptides derived from HIV-1 Rev inhibit HIV-1 integrase in a shiftide mechanism.** Biopolymers. 2008 Jan 24. [Epub ahead of print]

139- Ma J, Rong L, Zhou Y, Roy BB, Lu J, Abrahamyan L, Mouland AJ, Pan Q, Liang C. **The requirement of the DEAD-box protein DDX24 for the packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA.** Virology. 2008 May 25;375(1):253-64.

- 140- Exline CM, Feng Z, Stoltzfus CM. **Negative And Positive Mrna Splicing Elements Act Competitively To Regulate Hiv-1 Vif Gene Expression.** J Virol. 2008 Apr;82(8):3921-31
- 141- Ludwig C, Leiberer A, Wagner R. **Importance of protease cleavage sites within and flanking HIV-1 transframe protein p6* for spatiotemporal regulation of protease activation.** J Virol. 2008 May;82(9):4573-84.
- 142- Hübner W, Chen P, Del Portillo A, Liu Y, Gordon RE, Chen BK. **Sequence of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag localization and oligomerization monitored with live confocal imaging of a replication-competent, fluorescently tagged HIV-1.** J Virol. 2007 Nov;81(22):12596-607.
- 143- Salim A, Ratner L. **Modulation of {beta}-Catenin and E-Cadherin Interaction by Vpu Increases HIV-1 Particle Release.** J Virol. 2008 Apr;82(8):3932-8
- 144- Wittlich M, Koenig BW, Willbold D. **Structural consequences of phosphorylation of two serine residues in the cytoplasmic domain of HIV-1 VpU.** J Pept Sci. 2008 Jan 11. [Epub ahead of print]
- 145- Anderson JL, Hope TJ. **APOBEC3G restricts early HIV-1 replication in the cytoplasm of target cells.** Virology. 2008 May 25;375(1):1-12.
- 146- Tian C, Yu X, Zhang W, Wang T, Xu R, Yu XF. **Differential requirement for conserved tryptophans in human immunodeficiency virus type 1 Vif for the selective suppression of APOBEC3G and APOBEC3F.** J Virol. 2006 Mar;80(6):3112-5.
- 147- K A Stefano, R Collman, D Kolson, J Hoxie, N Nathanson, and F Gonzalez-Scarano **Replication of a macrophage-tropic strain of human**

immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in a hybrid cell line, CEMx174, suggests that cellular accessory molecules are required for HIV-1 entry. J. Virol. 1993 67: 6707-6715.

148- Pope Kosalaraksa, Mark F. Kavlick, Victor Maroun, Richard Le, and Hiroaki Mitsuya **Comparative Fitness of Multi-Dideoxynucleoside-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) in an In Vitro Competitive HIV-1 Replication Assay** J. Virol. 1999 73: 5356-5363.

Descripción General de la Interacción Primaria del VIH con un linfocito CD4

149- Navid Madani, Ana Luisa Perdigoto, Kumar Srinivasan, Jason M. Cox, Jason J. Chruma, Judith LaLonde, Martha Head, Amos B. Smith III,3 and Joseph G. Sodroski **Localized Changes in the gp120 Envelope Glycoprotein Confer Resistance to Human Immunodeficiency Virus Entry.** Inhibitors BMS-806 and #155 JOURNAL OF VIROLOGY, Apr. 2004, p. 3742–3752 Vol. 78, No. 7

150- Richard Wyatt and Joseph Sodroski. **The HIV-1 Envelope Glycoproteins: Fusogens, Antigens, and Immunogens.** Science. Vo. 280. 19 June 1998. p 1884-1888.

151- Kwong P, Wyatt R, Robinson J *et al.* **Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody.** Nature 1998; 393: 648-59.

152- Madani N, Perdigoto A, Srinivasan K *et al.* **Localizad changes in the gp120 envelope glycoprotein confer resistente to HIV entry inhibitors BMS-806 and #155.** J Virol 2004; 78: 7342-52

153- Sophia Rits-Volloch, Gary Frey, Stephen C. Harrison and Bing Chen.
Restraining the conformation of HIV-1 gp120 by removing a flexible loop The EMBO Journal (2006) 25, 5026–5035.

154- Verónica Briz, Eva Poveda and Vincent Soriano. **HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways termed hairpins** Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2006) 57, 619–627.

155- Dragic T, Trkola A, Lin S *et al.* **Amino-terminal substitutions in the CCR5 coreceptor impair gp120 binding and HIV type 1 entry.** J Virol 1998; 72: 279–85.

156- Wu L, LaRosa G, Kassam N *et al.* **Interaction of chemokine receptor CCR5 with its ligands: multiple domains for HIV-1 gp120 binding and a single domain for chemokine binding.** J Exp Med 1997; 186: 1373–81.

157- McKnight A, Wilkinson D, Simmons G, Talbot S, Picard L, Ahuja M, Marsh M, Hoxie JA, Clapham PR. **Inhibition of human immunodeficiency virus fusion by a monoclonal antibody to a coreceptor (CXCR4) is both cell type and virus strain dependent.** J Virol. 1997 Feb;71(2):1692-6.

158- Picard L, Wilkinson D, McKnight A *et al.* **Role of the amino-terminal extracellular domain of CXCR4 in HIV type 1 entry.** Virology 1997; 231: 105–11.

159- Chih-chin Huang, Son N. Lam, Priyamvada Acharya, Min Tang, Shi-Hua Xiang, Syed Shahzad-ul Hussan, Robyn L. Stanfield, James Robinson, Joseph Sodroski, Ian A. Wilson, Richard Wyatt, Carole A. Bewley, and Peter D. Kwong. **Structures of the CCR5 N Terminus and of a Tyrosine-Sulfated Antibody with HIV-1 gp120 and CD4** *Science*. 2007 September 28; 317(5846): 1930–1934

160- By Lijun Wu, Greg LaRosa, Nasim Kassam, Cynthia J. Gordon, Heidi Heath, Nancy Ruffing, Howard Chen, Jason Humblis, Michel Samson, Marc Parmentier, John P. Moore, and Charles R. Mackay **Interaction of Chemokine Receptor CCR5 with its Ligands: Multiple Domains for HIV-1 gp120 Binding and a Single Domain for Chemokine Binding** J. Exp. Med. Volume 186, Number 8, October 20, 1997 1373–1381.

161- Gregory B Melikyan, Emily J Platt and David Kabat. **The role of the N-terminal segment of CCR5 in HIV-1 Env-mediated membrane fusion and the mechanism of virus adaptation to CCR5 lacking this segment.** Retrovirology 2007, 4:55 doi:10.1186/1742-4690-4-55

162- Vasudha Sundaravaradan, Suman R Das, Rajesh Ramakrishnan, Shobha Sehgal, Sarla Gopalan, Nafees Ahmad and Shahid Jameel. **Role of HIV-1 subtype C envelope V3 to V5 regions in viral entry, correceptor utilization and replication efficiency in primary T- lymphocytes and monocyte - derived macrophages.** Virology Journal 2007, 4:126.

163- Chen B, Vogan EM, Gong H, Skehel JJ, Wiley DC, Harrison SC (2005b) **Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core.** Nature 433: 834–841.

164- Maerz AL, Drummer HE, Wilson KA, Pountourios P (2001). **Functional analysis of the disulfide-bonded loop/chain reversal region of human immunodeficiency virus type 1 gp41 reveals a critical role in gp120-gp41 association.** J Virol 75: 6635–6644

165- York J, Nunberg JH (2004) **Role of hydrophobic residues in the central ectodomain of gp41 in maintaining the association between human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein subunits gp120 and gp41.** J Virol 78: 4921–4926

- 166- Jacobs A, Sen J, Rong L, Caffrey M (2005) **Alanine scanning mutants of the HIV gp41 loop.** *J Biol Chem* 280: 27284–27288.
- 167- Sunghwan Kim, Hongbo Pang, and Michael S. Kay **Peptide Mimic of the HIV Envelope gp120-gp41 Interface** *J Mol Biol.* 2008 February 22; 376(3): 786–797.
- 168- Colman, P. M., and M. C. Lawrence.. **The structural biology of type 1 viral membrane fusion.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*2003. **4**:309–319.
- 169- Tara R. Suntok and David C. Chan **The Fusion Activity of HIV-1 gp41 Depends on Interhelical Interactions** *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 280, No. 20, Issue of May 20, p. 19852–19857, 2005
- 170- Séverine Bär and Marc Alizon. **Role of the Ectodomain of the gp41 Transmembrane Envelope Protein of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Late Steps of the Membrane Fusion Process.** *Journal Of Virology*, Jan. 2004, p. 811–820 Vol. 78, No. 2.
- 171- Jahn, R., T. Lang, and T. C. Südhof. **Membrane fusion.** *Cell* 2003. **112**:519–533.
- 172- Wild C, Oas T, Mc Danal D *et al.* **A synthetic peptide inhibitor of HIV replication; correlation between solution structure and viral inhibition.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89; 10537-41.
- 173- Blumenthal, R., M. J. Clague, S. R. Durell, and R. M. Epand. **Membrane fusion.** *Chem Rev* 2003. **103**:53–69.
- 174- Wen Yuan,¹ Jessica Bazick,¹ and Joseph Sodroski **Characterization of the Multiple Conformational States of Free Monomeric and Trimeric Human**

Immunodeficiency Virus Envelope Glycoproteins after Fixation by Cross-Linker Journal Of Virology, July 2006, p. 6725–6737 Vol. 80, No. 14.

175- Barouch D., Lemcker A., Havenga M. *et al.* **Immunogenicity of heterologous prime-boost vaccine regimens involving adenovirus serotypes.** AIDS Vaccine Lausanne (2004)11 and 35. (Abstract 14)

176- Harrison SC (2005) **Mechanism of membrane fusion by viral envelope proteins.** Adv Virus Res 64: 231–259

Estudios Previos Sobre la Estructura de CD4

177- Michale R. Bowman, Kurtis D. MacFerrin, Stuart L. Schreiber, and Steven J. Burakoff. **Identification and structural análisis of residues in the V1 region of CD4 involved in interaction with human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120 and class II major histocompatibility complex molecules.** Proc Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 87, p. 9052-9056, November 1990.

178- Avi Ashkenazi, Leonard G. Presta, Scot A. Marsters, Thomas R. Camerato, Kim A. Rosenthal, Brian M. Fendlyt, And Daniel J. Capon. **Mapping the CD4 binding site for human immunodeficiency virus by alanine-scanning mutagenesis** Proc. Nad. Acad. Sci. USA Vol. 87, p. 7150-7154, September 1990

179- Paul Jay Maddon, Susan M. Molineauxt, Douglas E. Maddont, Kathryn A. Zimmerman, Maurice Godfrey, Frederick W. Alt, Leonard Chess, And Richard Axel **Structure and expression of the human and mouse T4 genes** Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 84, p. 9155-9159, December 1987

180- Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R. **The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain.** Cell. 1986 Nov 7;47(3):333-48.

181- Christopher C. Broder and Edward A. Berger. **CD4 Molecules with a Diversity of Mutations Encompassing the CDR3 Region Efficiently Support Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein-Mediated Cell Fusion.** Journal of Virology, Feb. 1993, p. 913-926.

182- Denis Brand, Kumar Srinivasan and Joseph Sodroski. **Determinants of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry in the CDR2 Loop of the CD4 Glycoprotein.** Journal of Virology, Jan 1995, p. 166-171

183- Prabakaran P, Gan J, Wu YQ, Zhang MY, Dimitrov DS, Ji X. **Structural mimicry of CD4 by a cross-reactive HIV-1 neutralizing antibody with CDR-H2 and H3 containing unique motifs.** J Mol Biol. 2006 Mar 17;357(1):82-99.

Estudios Previos Sobre la Estructura de gp120

184- Thomas Leitner *et al.* **HIV Sequence Compendium 2006/2007** Los Alamos Database and Análisis New Mexico, U.S.A. 2007. P:556-615
<http://hiv.lanl.gov>

Otras Revisiones

185- James W. Murphy, Yoonsang Cho, Aristidis Sachpatzidis, Chengpeng Fan, Michael E. Hodsdon, and Elias Lolis **Structural and Functional Basis of CXCL12 (Stromal Cell-derived Factor-1_α) Binding to Heparin.** The Journal Of Biological Chemistry Vol. 282, NO. 13, p. 10018–10027, March 30, 2007

186- O'Connor DH, Burton DR. **Immune responses and HIV: a little order from the chaos.** J Exp Med. 2006 Mar 20;203(3):501-3.

187- <http://beta.uniprot.org/uniprot/P61073>

188- <http://beta.uniprot.org/uniref/?query=ccr5+AND+human+AND+identity%3A1.0&sort=score>

189- <http://www.wwpdb.org/>

Resultados

190- Shuqun Liu · Shixiu Fan · Zhirong Sun **Structural and functional characterization of the human CCR5 receptor in complex with HIV gp120 envelope glycoprotein and CD4 receptor by molecular modeling studies** *J Mol Model* (2003) 9:329–336

191- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., and Ferrin, T.E. **"UCSF Chimera - A Visualization System for Exploratory Research and Analysis."** *J. Comput. Chem.* **25**(13):1605-1612 (2004).

192- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K. and Olson, A. J. (1998), **Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and Empirical Binding Free Energy Function** *J. Computational Chemistry*, **19**: 1639-1662.

193- Michel F. Sanner. Python: **A Programming Language for Software Integration and Development.** *J. Mol. Graphics Mod.*, 1999, Vol 17, February. pp57-61

Discusión de Resultados

194- Beatrice Labrosse, Carole Treboute, Anne Brelot, and Marc Alizon. **Cooperation of the V1/V2 and V3 Domains of Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 for Interaction with the CXCR4 Receptor** . JOURNAL OF VIROLOGY, June 2001, p. 5457–5464

195- Paul R. Gorry, Rebecca L. Dunfee, Megan E. Mefforda, Kevin Kunstmand, Tom Morgane, John P. Mooree, John R. Mascolaf, Kristin Agopiana, Geoffrey H. Holma, Andrew Mehlea, Joann Taylor, Michael Farzana, Hui Wang, Philip Ellery, Samantha J. Willeyi, Paul R. Claphami, Steven M. Wolinsky, Suzanne M. Croweg and Dana Gabuzdaa. **Changes in the V3 Region of gp120 Contribute to Unusually Broad Coreceptor Usage of an HIV-1 Isolate from a CCR5 Δ 32 Heterozygote** . Virology. 2007 May 25; 362(1): 163–178.

10. Anexos

Estructura proteica de gp120